Synthesen von Amadori-Verbindungen der Anthranilsäure

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ECKHARD SCHRAVEN
aus Oberhausen-Sterkrade

- 1962 -

7143

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549606_0008

Synthesen von Amadori-Verbindungen der Anthranilsäure

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Eckhard Schraven

aus
Oberhausen-Sterkrade

-1962-

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1. Referent: Prof. Dr. H.Hellmann

2. Referent: Prof. Dr. G.Weitzel

Dekan: Prof. Dr. W.Braunbek

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1959 bis September 1961 unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr.F.Lingens im Arbeitskreis von Herrn Professor Dr.H.Hellmann am Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Dozenten Dr.F.Lingens danke ich sehr herzlich für vielseitige Anregungen und grosszügige Unterstützung. Ebenfalls möchte ich Herrn Professor Dr.H.Hellmann für die Ueberlassung eines Arbeitsplatzes und Frau S.Lingens für die Durchführung der Wachstumsversuche herzlich danken.

Inhalt

Einleitung

Ueberblick über den Verlauf der biologischen Synthese des Tryptophans..... 13

Ziel der Arbeit..... 20

Theoretischer Teil

I. Kurzer Ueberblick über Bedeutung, Bedingungen und Mechanismus der Amadori-Umlagerung..... 23

II. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

1. Aus Anthranilsäure und einem in 6-Stellung substituierten Zucker.

a) 6-O-Trityl-D-glucose..... 29

b) 6-O-Benzoyl-D-glucose..... 31

2. Versuche zur Herstellung von Amadori-Verbindungen N-substituierter Anthranilsäuren..... 31

3. Versuche zur Herstellung von Amadori-Verbindungen aus Anthranilsäureestern..... 33

4. Versuche zur Herstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose..... 34

a) Durch saure Hydrolyse..... 34

b) Durch Hydrogenolyse des Benzalrestes..... 36

c) Durch Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie..... 38

5. Versuche zur Darstellung von Salzen der 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose..... 39

III. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose.

1. Aus Anthranilsäure und 5-O-Trityl-D-ribose.. 40
2. Aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-ribosylamin und Triphenylchlormethan..... 41
3. Aus Anthranilsäure und 5-O-Trityl-D-arabinose..... 42
4. Aus Anthranilsäure und 5-O-Benzyl-D-ribose.. 43
5. Aus D-Arabinose und N-Benzylanthranilsäure.. 44
6. Versuche zur Herstellung von 4,5-Monoaceton-D-arabinose..... 44
7. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose durch präparative Dünnschichtchromatographie..... 45

IV. Austestung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose an Tryptophan-Mangelmutanten und an tryptophanabhängigen Mikroorganismen..... 47

V. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat..... 49

1a. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat..... 50
b. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat..... 51
c. Versuche zur Synthese von D-Ribose-5-diphenylphosphat..... 52
2a. Versuche zur Veresterung von D-Glucose mit Dibenzylphosphorsäure..... 53
b. Versuche zur Veresterung von D-Glucose und D-Arabinose mit Diphenylphosphorsäure..... 54

3. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat bzw. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin bzw. N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin und Phosphoroxychlorid..... 54

4. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat durch präparative Dünnschichtchromatographie.

a) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat..... 55

b) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat..... 57

VI. Versuche zur Synthese von Amadori-Verbindungen mit verschiedenartig substituiertem Zuckeranteil.

1. Versuche zur Herstellung von Kondensationsprodukten aus D-Glucose und Aldehyden. Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-4,6-äthyliden-D-glucosylamin und Versuche zur Darstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-äthyliden-D-fruktose..... 58

2. Versuche zur Herstellung einer Amadori-Verbindung aus Rhamnose und Anthranilsäure..... 61

E x p e r i m e n t e l l e r T e i l

1. N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin... 65

2. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-6-O-trityl-D-fruktose..... 65

3. Versuch zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-benzoyl-D-glucosylamin..... 66

4. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-N-benzyl-D-glucosylamin..... 66
5. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-D-fruktose..... 67
6. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose..... 67
7. Versuche zur Synthese von N-(o-Carbmethoxyphenyl)-D-glucosylamin..... 68
8. Versuch zur Synthese von N-(o-Carbmethoxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin..... 68
9. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carbmethoxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose..... 68
10. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.
a) Durch saure Hydrolyse..... 69
b) Durch Hydrogenolyse..... 70
c) Durch präparative Dünnschichtchromatographie 71
11. Versuch zur Herstellung des Brucinsalzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose. 72
12. S-Benzylisothiuroniumsalz von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose.... 72
13. Versuch zur Herstellung des S-Benzylisothiuroniumsalzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose..... 73
14. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-trityl-D-ribosylamin..... 73
15. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-trityl-D-ribulose..... 74
16. Versuch zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-trityl-D-arabinosylamin..... 74
17. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-trityl-D-ribulose aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin..... 75
18. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-benzyl-D-ribosylamin und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-benzyl-D-ribulose..... 76

19. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-D-ribulose..... 76
20. Versuche zur Synthese von 4,5-Monoaceton-D-arabinose..... 76
21. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose..... 76
22. Austestung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose an Tryptophan-Mangelmutanten und an tryptophanabhängigen Mikroorganismen..... 77
23. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat aus 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose und Dibenzylphosphorylchlorid..... 80
24. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat aus 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat..... 81
25. Versuch zur Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl-D-ribose..... 83
26. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat aus D-Glucose und Dibenzylphosphorsäure..... 83
27. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-dibenzylphosphat.. 84
28. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat aus D-Glucose und Diphenylphosphorsäure..... 84
29. Versuch zur Synthese von D-Arabinose-5-diphenylphosphat..... 85
30. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin und Phosphoroxychlorid..... 85
31. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin und Phosphoroxychlorid..... 86

32. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat.
a) Durch Säulenchromatographie..... 86
b) Durch präparative Dünnschichtchromatographie 87
33. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat durch präparative Dünnschichtchromatographie..... 87
34. N-(o-Carboxyphenyl)-4,6-äthyliden-D-glucosylamin..... 88
35. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-äthyliden-D-fruktose..... 88
36. Versuch zur Herstellung von 4,6-n-Propyliden-D-glucose..... 89
37. Versuche zur Synthese von 4,6-Isobutyliden-D-glucose..... 89
38. Versuch zur Herstellung von 4,6-(2-Aethyl-butyliden)-D-glucose..... 90
39. Versuche zur Synthese von 4,6-(p-Methoxybenzal)-D-glucose..... 90
40. Versuche zur Synthese von 4,6-(p- und m-Nitrobenzal)-D-glucose..... 90
41. N-(o-Carboxyphenyl)-rhamnosylamin..... 91
42. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-rhamnoketose..... 92
43. N-(p-Toluidino)-2-desoxy-D-glucosylamin..... 92

Z u s a m m e n f a s s u n g 93

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 95

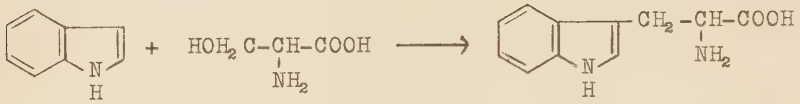
Einleitung

Ueberblick über den Verlauf der biologischen Synthese des Tryptophans.

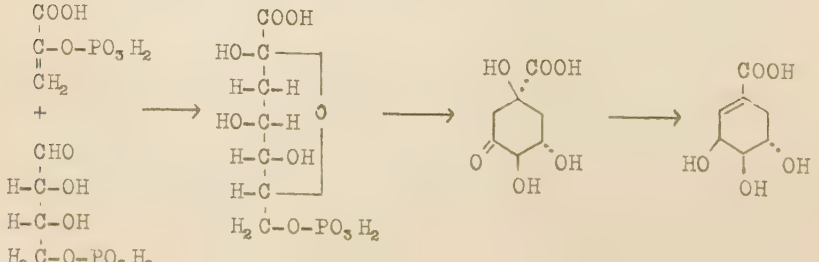
Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, das heisst, es kann nicht vom tierischen Organismus, wohl aber von vielen Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert werden. Seine Biogenese wurde seit etwa 1940 eingehend untersucht. Fildes (19, 20) konnte 1941 zeigen, dass bei Salmonella und Corynebakterium Indol anstelle von Tryptophan verwertet werden kann, während Snell (76) 1943 fand, dass bei Lactobacillus arabinosus Anthranilsäure und Indol im Wachstumsversuch Tryptophan ersetzen können. Der biologische Aufbau verläuft also über wohldefinierte Zwischenstufen, wobei jeder Syntheseschritt durch ein Enzym gesteuert wird. Die Zwischenprodukte sind im allgemeinen nicht fassbar, da sie nur in verschwindend kleiner Konzentration in der Synthesekette vorliegen. Eine Unterbrechung der Reaktionskette kann aber bei Mikroorganismen durch Mutation eines Gens, das für den Aufbau eines Enzyms dieser Kette verantwortlich ist, künstlich hervorgerufen werden. Solche Mutationen werden durch chemische Agentien, Röntgen- oder UV-Strahlen ausgelöst, sie treten aber auch in geringem Masse spontan auf. Der geschädigte Mikroorganismus ist nur noch zur Synthese bis zur Unterbrechungsstelle befähigt, und die Verbindung unmittelbar vor dieser Blockierung wird unter günstigen Bedingungen angehäuft und ins Kulturmedium abgegeben. Die Isolierung eines solchen Akkumulates kann dann zur Aufklärung eines Zwischenproduktes der Synthesekette führen.

Im Jahre 1943 gelang es Tatum, Bonner und Beadle (81,82) zum ersten Male, im Medium von Neurospora crassa-Mangelmutanten Anthranilsäure und Indol nachzuweisen. Tatum und Bonner (81) vermuteten, dass Tryptophan durch Kondensation von Indol mit Serin gebildet wird. Dieser Reaktionsschritt

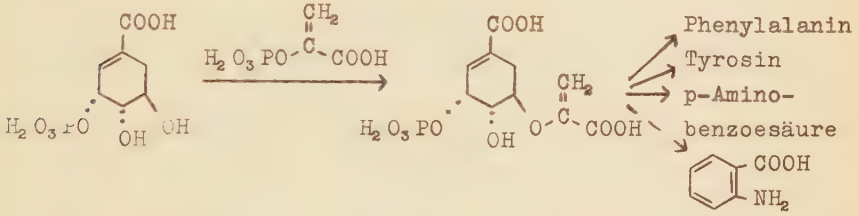
wird durch ein Ferment, das als Cofaktor Pyridoxalphosphat besitzt, katalysiert (84). Die Tryptophansynthetase wurde von Yanofsky (93) angereichert und gereinigt. Mit ihrer Hilfe untersuchten Tatum und Shemin (83) die Kondensation von Indol mit ^{15}N-α-β-Deuterioserin. Da das isolierte Tryptophan kein α-Deuteriumatom enthielt, konnte geschlossen werden, dass aus Serin zunächst durch intramolekulare Wasserabspaltung α-Aminoacrylsäure entsteht, die durch Addition an Indol Tryptophan bildet.



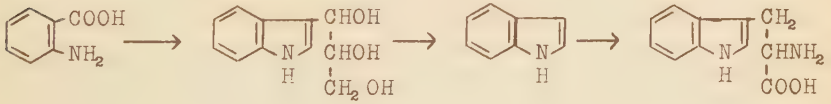
Ueber die direkten Vorstufen der Anthranilsäure ist bisher nur wenig bekannt. Sie entsteht aber mit den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und p-Aminobenzoesäure aus einer gemeinsamen Biosynthesekette. Als ein Glied dieser Kette wurde von Davis (14) die Shikimisäure (3,4,5-Trihydroxy-cyclohexen-1-carbonsäure) gefunden, die aus den Medien von Coli- und Aerobacter-Mutanten isoliert werden konnte (73). Salamon und Davis (71) wiesen nach, dass Shikimisäure direkt aus 5-Dehydroshikimisäure entsteht, die nach Weiss, Davis und Mingioli (87) wiederum aus 5-Dehydrochinasäure gebildet wird. Die Synthese der 5-Dehydrochinasäure verläuft nach Srinivasan, Katagiri und Sprinson (77,78) wahrscheinlich über die 2-Keto-3-desoxy-D-araboheptonsäure-7-phosphorsäure, die durch Kondensation von D-Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolbrenztraubensäure entsteht, und durch Cyclisierung 5-Dehydrochinasäure liefert.



Ueber die Verzweigungsstelle, die vom Syntheseweg der Aromaten zu den einzelnen Aminosäuren führt, besteht noch wenig Klarheit. Davis und Mingioli (15) fanden als Folgeprodukt der Shikimisäure eine Verbindung, die sie "compound Z_1" nannten, und die von Levin und Sprinson (45) als 3-Enol-pyruvyl-shikimisäure-5-phosphat identifiziert wurde.

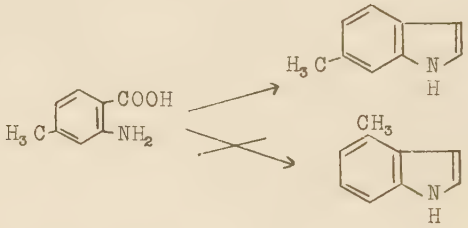


Genauer untersucht wurde die Umwandlung von Anthranilsäure in Indol. Im Jahre 1957 gelang es Lingens, Burckhardt, Hellmann und Kaudewitz (46), aus dem Medium der Mangelmutanten try-8 von Salmonella typhimurium, deren genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, Indol-3-glycerin nachzuweisen und zu isolieren. Die gleiche Verbindung war bereits früher im Medium der Mangelmutanten 7/8 von Escherichia coli gefunden, aber nicht identifiziert worden (23). Damit ergab sich folgende Synthesekette:



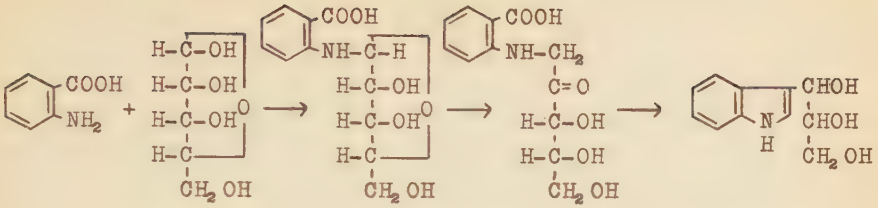
Mit ^{15}N-markierter Anthranilsäure wurde bewiesen, dass der Stickstoff der Anthranilsäure direkt an der Bildung des Indolringes beteiligt ist (66). Ausserdem konnte mit Hilfe von Carboxyl-C markierter Anthranilsäure gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe der Anthranilsäure eliminiert wird (64). Zur Bildung des Indolringes werden also zwei weitere C-Atome benötigt, da der aromatische Kern der Anthranilsäure erhalten bleibt. Es lag daher die Vermutung nahe, dass ein Zucker

über das N-Glykosid der Anthranilsäure an der Bildung des Indolringes beteiligt sein könnte. Diese Vermutung wurde durch Yanofsky (94) dadurch bestätigt, dass er Mikroorganismen mit an den Kohlenstoffatomen C-1 und C-2 markierter Ribose und Glucose züchtete und dabei feststellte, dass diese Zuckermoleküle die Atome 2 und 3 des Indolringes bildeten. Einen weiteren Beweis für die primäre Bildung einer N-Ribosylverbindung konnte Yanofsky (95) dadurch erbringen, dass er diese Reaktion mit Fermentextrakten aus Escherichia coli in vitro genauer untersuchte und dabei feststellte, dass die Indolbildung durch Zugabe von 1-Pyrophosphoryl-ribose-5-phosphat oder Adenosintriphosphat und Ribose bzw. Ribose-5-phosphorsäure begünstigt wird. Weitere Versuche mit Fermentextrakten aus Escherichia coli zeigten, dass der Ringschluss zum Indol über die 1-Stellung der Anthranilsäure erfolgen muss, da 4-Methylanthranilsäure in 6-Methylindol und nicht in 4-Methylindol umgewandelt wird (96).



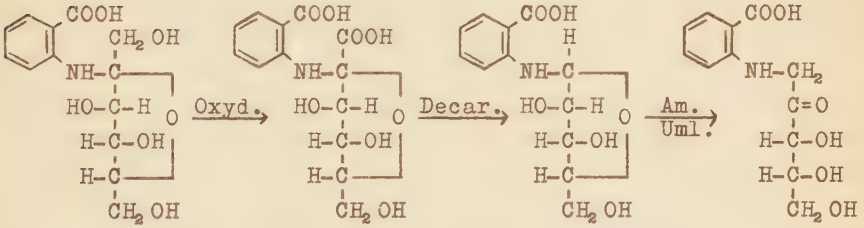
Da Anilin kein Indol bildet (6), müssen Decarboxylierung und Ringschluss gekoppelte Reaktionen sein.

Bei der systematischen Suche nach den fehlenden Gliedern der Synthesekette wurden verschiedene Mangelmutanten, deren genetischer Block zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, ausgetestet. Im Medium zweier Aerobacter aerogenes-Mutanten und bei Escherichia coli konnte dann auch eine Zucker-Aminosäure-Verbindung gefunden werden und zwar die Amadori-Verbindung 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose (24,16). Damit ergibt sich folgendes Reaktionsschema:

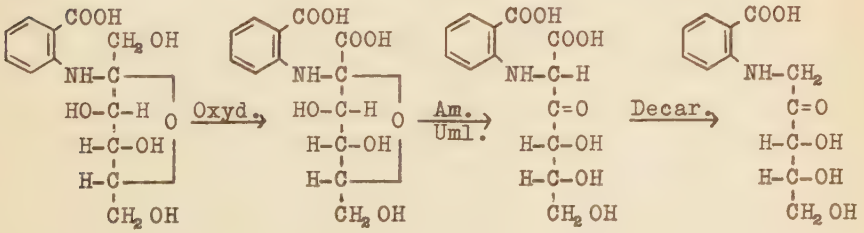


Ausserdem konnte aber auch im Medium zweier Mutanten von Salmonella typhimurium N-(o-Carboxyphenyl)-D-fruktosylamin nachgewiesen werden (48). Nimmt man an, dass diese Verbindung das unmittelbare Folgeprodukt der Anthranilsäure ist, so ergeben sich zwei theoretische Möglichkeiten für den Ablauf der Tryptophanbiosynthese zwischen Anthranilsäure und Indolylglycerin (48).

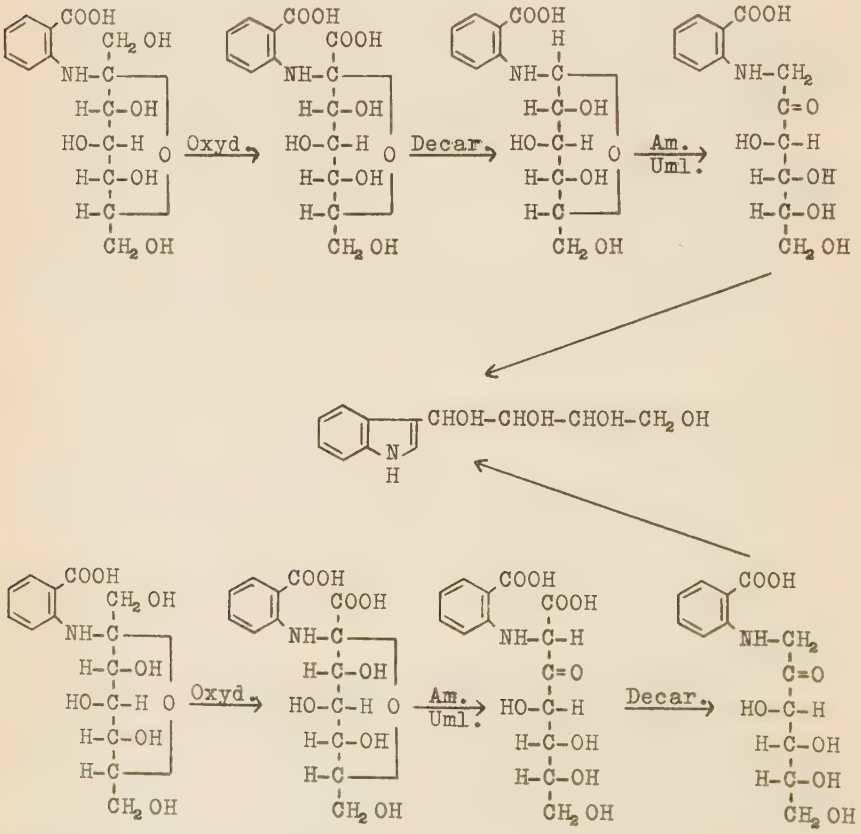
1. Bildung eines Fruktosides, Oxydation zur 2-Ketogluconsäure, deren Decarboxylierung und Amadori-Umlagerung des gebildeten Arabinosylamins.



2. Oxydation des Fruktosides, Amadori-Umlagerung der 2-Ketogluconsäure und anschliessende Decarboxylierung.



Da im Medium der Mangelmutanten H 19 und AE 7 des Saccharomyces cerevisiae-Stammes S 288C und der Neurospora crassa-Mutante 81 die Amadori-Verbindung 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose nachgewiesen wurde, kann man in Analogie zum Vorigen bei diesen Mikroorganismen folgenden Syntheseweg annehmen, der von einer Anthranilsäure-heptulose-Verbindung zum Indolylerythrit führen würde (49,50):



Alle bisher nachgewiesenen Verbindungen wurden im Kulturmedium nur in entphosphorylierter Form aufgefunden (46,47). Yanofsky (97) konnte aber nachweisen, dass bei Enterobakteriaceen der Uebergang von Anthranilsäure zum Indol über den Phosphorsäureester des Indolylglycerins erfolgt. Da bekanntlich Phosphorsäureester die Zellmembran nicht oder nur sehr schwer passieren können (4), ist anzunehmen, dass alle im Kulturmedium aufgefundenen Verbindungen Kunstprodukte sind und die Synthese in vivo über die Phosphorsäureester der postulierten Verbindungen verläuft.

Z i e l d e r A r b e i t.

Ausgehend von der Tatsache, dass von verschiedenen Arbeitskreisen 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose als Zwischenprodukte bei der Biosynthese des Tryptophans nachgewiesen werden konnten, sollten zunächst diese beiden, als Kunstprodukte angesehenen Amadori-Verbindungen der Anthranilsäure synthetisiert werden. Gleichzeitig wurden auch Synthesen für die Phosphorsäureester von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose angestrebt, um die Eigenschaften der reinen Amadori-Verbindungen untersuchen und die synthetisierten Verbindungen mit den aus Akkumulaten gewonnenen Produkten vergleichen und in Wachstumsversuchen austesten zu können. Schliesslich sollten die Glykosylaminbildung und die Umlagerungstendenz bei verschiedenartig substituierten Zuckern und Anthranilsäure untersucht werden, da bekannt war, dass zwar nach Befunden von Micheel Derivate der Anthranilsäure nur wenig zur Amadori-Umlagerung befähigt sind, die Umlagerungstendenz aber durch Substitution sowohl des Zucker- als auch des Aminanteils beeinflusst werden kann.

Theoretischer Teil

I. Kurzer Ueberblick über Bedeutung, Bedingungen und Mechanismus der Amadori-Umlagerung.

N-Glykoside von Aminen und Aminosäuren und die aus ihnen durch Umlagerung entstehenden Amadori-Verbindungen haben in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewonnen. Sie treten nicht nur als Zwischenprodukte bei der Biosynthese der verschiedensten Naturstoffe auf, sondern sie sind auch als Bestandteil von Naturstoffen wie zum Beispiel der Mucoproteine (25,26) zu finden. Als Vorprodukte des Tryptophans wurden ausserdem bei Enterobakteriaceen 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose (16,24) und bei Saccharomyces cerevisiae und Neurospora crassa 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose (49,50) gefunden. Aehnlich aufgebaute Verbindungen treten auch bei der Biosynthese des Histidins (5), Leucopterins (90) und Lactoflavins (91) auf. Amadori-Verbindungen sollen ausserdem in der Lage sein, den Einbau von Aminosäuren in die Proteine von Reticulocyten zu stimulieren. Sie sind kurze Zeit nach dem Tode in der Leber nachweisbar, jedoch nicht in lebender Leber, sodass ihre biochemischen Funktionen noch ungeklärt sind (1,8,9). Da Amadori-Verbindungen überall dort entstehen können, wo Zucker und Amine bzw. Aminosäuren miteinander in Berührung kommen, sind sie auch als Zwischenprodukte bei der Bildung von Huminstoffen anzusehen. Diese Reaktion ist unter dem Namen "Maillard-Reaktion" oder "Nicht-enzymatische Bräunungsreaktion" bekannt (53,18). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen mit dem Ziel, genauere Kenntnisse über Ablauf, Tendenz und Bedingungen der Amadori-Umlagerung in Abhängigkeit von den Komponenten zu gewinnen.

Als Aminanteil können aromatische und aliphatische (54), primäre und sekundäre (35,36) Amine und Aminosäuren (17,34), als Zuckerkomponente alle Aldosen einschliesslich der Aldotriosen (7,74,75,80) eingesetzt werden. Die Umlagerung erfolgt nach der klassischen Methode von Kuhn und Weygand (41)

am besten durch Erhitzen in verdünnten Säuren. Sie tritt aber auch ein bei Erwärmen oder Stehenlassen bei Zimmertemperatur in niederen Alkoholen oder Wasser und kann durch Spuren von Ammoniumchlorid, Essigsäure, Oxalsäure oder anderen organischen Säuren, ja selbst durch methylenaktive Verbindungen katalysiert werden. Auch durch Erhitzen in inerten Lösungsmitteln wie Dioxan, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd und anderen kann eine Umlagerung erreicht werden. Durch Titration mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol konnten Rosen, Woods und Pigman (70) zeigen, dass Glucose mit p-Toluidin im System Pyridin/Eisessig optimal umlagert. Demnach erscheint die Amadori-Umlagerung als eine säure-basen-katalysierte Reaktion.

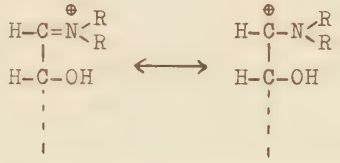
Amadori-Verbindungen lassen sich am besten durch Umlagerung eines Glykosylamines darstellen, es gelang aber auch, sie direkt aus den Komponenten ohne Isolierung des Glykosides zu synthetisieren. Unter günstigen Bedingungen können sie nach Abdampfen der oben erwähnten Lösungsmittel in guten Ausbeuten kristallin erhalten werden. Häufig erfolgte die Isolierung durch Reinigung über Ionenaustauscher (1,8,9,31, 32,34), manchmal auch durch Vergärung des überschüssigen Zuckers und Fällung der Amadori-Verbindung mit Aether (40). Ausserdem gelang es, Amadori-Verbindungen als Metallkomplexe (88) oder als Oxazolidinverbindungen (30) zu fällen.

Den Einfluss des stickstoffhaltigen Aglykons untersuchten Micheel und Schleppinghoff (55). Sie stellten fest, dass die Amadori-Umlagerung bei substituierten, aromatischen Aminen dann begünstigt ist, wenn die Substitution auf die Elektronenverteilung des aromatischen Ringes so wirkt, dass die Elektronendichte am N-tragenden C-Atom und damit die Basizität des Aminstickstoffs erhöht wird. Heyns und Baltes (30) konnten zeigen, dass der mesomere Effekt des unsubstituierten Phenylkerns eine Schwächung des Elektronenpaares am Stickstoff bewirkt, da sekundäre, aromatische Amine wie Diphenylamin weniger zur Umlagerung befähigt sind, als zum Beispiel Dibenzylamin. Es scheint also die Basizität der Aminogruppe von grosser Bedeutung für die Amadori-Umlagerung

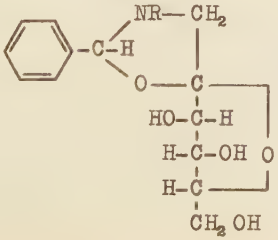
zu sein (61,68).

Weit weniger ist bekannt über den Einfluss, der durch Substitution des Zuckeranteils auf die Umlagerungstendenz ausgeübt wird. Schon Helferich und Porck (27) hatten beobachtet, dass 4,6-Benzalverbindungen besonders gut zur Umlagerung befähigt sind. Ebenso wird durch Blockierung der 6-Stellung die Amadori-Umlagerung erleichtert (57,58,59).

Nach neueren Untersuchungen von Heyns und Baltes (30) soll die Leichtigkeit, mit der der Halbacetalring geöffnet werden kann, für den Ablauf der Amadori-Umlagerung von Bedeutung sein. Dabei soll über die Bildung eines Carbonium-Immonium-Ions die Wasserstoff-Verschiebung und damit die Umlagerung ausgelöst werden.



Nach Micheel und Frowein (56), sowie Kuhn und Krüger (42) liegen 1-Amino-1-desoxy-fruktosen bei nicht möglicher Ausbildung des Pyranoseringes in der offenen Carbonylform vor, der die CO-Bande im IR-Spektrum bei 1721 cm^{-1} zugeordnet wurde. Weygand und Mitarbeiter (89) konnten aber am Modell zeigen, dass für das Auftreten der offenen Form keine sterischen Gründe massgebend sein können. Ausserdem wurde in neuester Zeit durch Umsetzung von Isoglucosaminuronsäure und einiger ihrer N-substituierter Derivate mit Benzaldehyd ein Halbketalring nachgewiesen, da sich bei dieser Reaktion eine Oxazolidin-Verbindung bildet (30).



Bei diesen Verbindungen zeigte sich auch, dass die von Micheel und Schleppinghoff (55) als charakteristisch für Amadori-Verbindungen bezeichnete Bande im IR-Spektrum bei 3570 cm^{-1} nicht einheitlich auftrat. Es ist bisher also noch nicht möglich, bestimmte Banden als charakteristisch für alle Amadori-Verbindungen anzusehen.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Amadori-Verbindungen ist ihre leichte Enolisierbarkeit in alkalischem Medium. Sie wirken daher bedeutend stärker reduzierend als Fruktose und können leicht mit Hilfe von Redoxindikatoren wie o-Dinitrobenzol (25,35,36,41,43), Methylenblau (25,35,36,43) oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol (41,43) nachgewiesen und auf diese Weise gut von Glucose und Glykosylaminen unterschieden werden. Auch Kaliumpermanganat, Fehling'sche Lösung oder Tollens-Reagenz werden reduziert. Auf dem Papierchromatogramm lassen sich Amadori-Verbindungen mit alkalischer Triphenyltetrazoliumchloridlösung nachweisen (86). Beim Besprühen tritt bereits bei Zimmertemperatur intensive Rotfärbung ein, während andere Zucker erst nach Erwärmen reagieren.

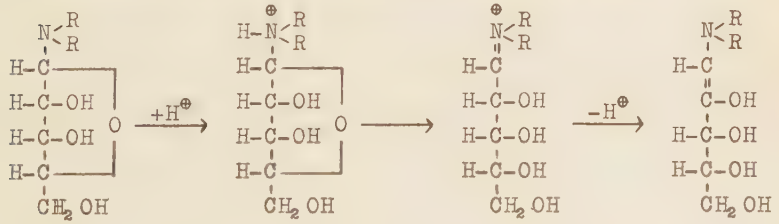
Die grosse Labilität der Amadori-Verbindungen beruht zum Teil auf der leichten Spaltbarkeit des Endiols in alkalischer Lösung oder in schwachen Säuren. Dabei wird das Ausgangsamin freigesetzt, während sich der Zucker in Furfurol bzw. Hydroxymethylfurfurol umwandelt, wie papierchromatographisch nachgewiesen wurde (25). Die freie Zuckerkomponente konnte bisher in keinem Falle gefunden werden. Die Stabilität der Amadori-Verbindungen kann nach Untersuchungen von Micheel und Heesing (60) durch Einbeziehung des glykosidischen Stickstoffatoms in ein Resonanzsystem so stark erhöht werden, dass weitgehende Resistenz gegen durch Wasserstoffionen katalysierte Hydrolyse eintritt. Dadurch wird die ungewöhnlich hohe Stabilität der Purin- und Pyrimidinglykoside in den Nucleosiden erklärt. Die Säurebeständigkeit der Amadori-Verbindungen ist ausserdem von der Konstitution des Zuckerrestes abhängig (pyranoid, furanoid, ketosid usw.).

Der Mechanismus der Amadori-Umlagerung ist bis heute noch nicht endgültig geklärt, da zahlreiche Zwischen- und Neben-

produkte der Zersetzung, vor allem solche huminartiger Struktur noch nicht identifiziert werden konnten. Der italienische Chemiker Mario Amadori, nach dem die Umlagerung benannt wurde, entdeckte in den Jahren 1925-27 (2,3), dass bei der Kondensation von Glucose mit aromatischen Aminen wie p-Toluidin, p-Phenitidin oder p-Anisidin zwei strukturmässig verschiedene Isomere entstehen, und er konnte zeigen, dass es sich dabei nicht um α-β-Anomere handelte, wie sie bei der Lobry-de-Bruyn - van Ekenstein-Umlagerung entstehen. Er stellte ausserdem fest, dass das eine der Isomeren stabiler war als das andere und identifizierte das labilere als das N-Glykosylamin. Er erkannte aber nicht, dass das stabilere Derivat durch Umlagerung entstanden war. Die richtige Deutung dieser Reaktion erfolgte erst 1937 durch Kuhn und Weygand (41), nachdem sie die Struktur der Verbindung aufklären konnten.

Heute versteht man unter einer "Amadori-Umlagerung" die Isomerisierung einer 1-Amino-1-aldose zu einer 1-Amino-1-desoxy-2-ketose, für die folgende Mechanismen diskutiert werden:

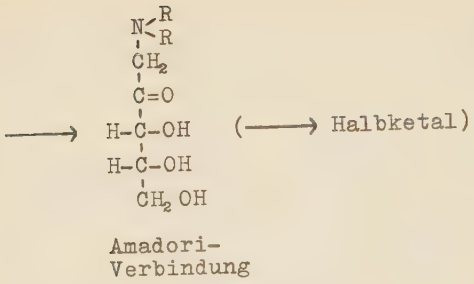
1. Kuhn und Weygand (41): Nach Anlagerung eines Protons an das Glykosylamin bildet sich unter Aufspaltung des Halbacetalringes und Protonenwanderung intermediär eine Schiff'sche Base, die sich nach Abspaltung des Protons über ein Ketoenol zur Amadori-Verbindung stabilisiert.



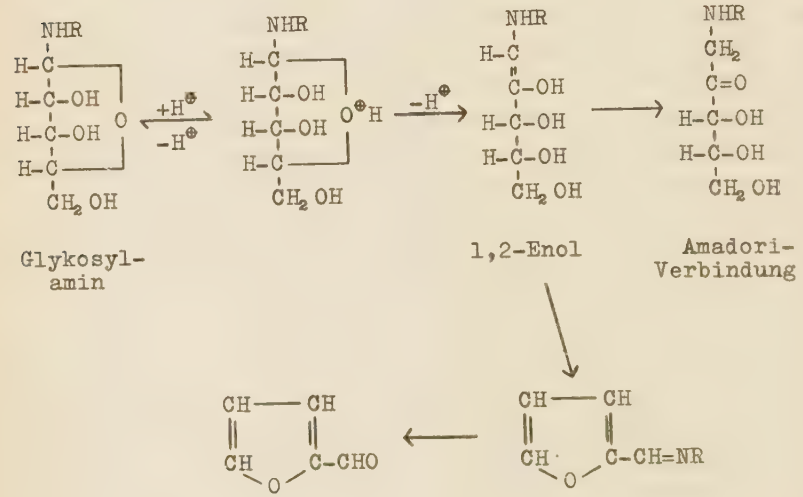
Glykosyl-amin

Schiff'sche Base

1,2-Enol



2. Gottschalk (25): Die Ringöffnung erfolgt aus einer Oxoniumstruktur, wie sie für α-Aminohalbmercaptale (92) nachgewiesen wurde. Auf diese Weise wird die Formulierung der Azomethingruppe vermieden und die zu beobachtende, leichte Bildung von Furfurol bzw. Hydroxymethylfurfurol erklärt.



II. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

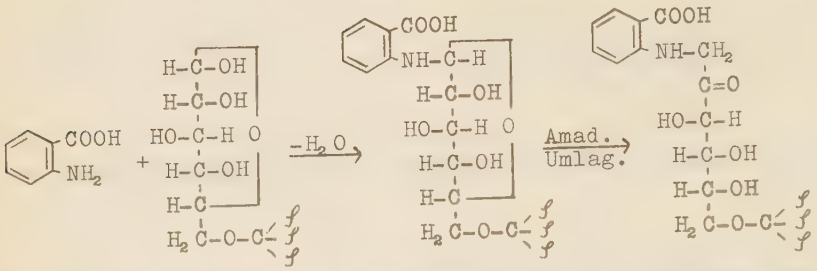
1. Aus Anthranilsäure und einem in 6-Stellung substituierten Zucker.

a) 6-O-Trityl-D-glucose.

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose konnte als Vorprodukt des Indols bei der Biosynthese des Tryptophans in Saccharomyces cerevisiae und Neurospora crassa nachgewiesen werden (49,50). Diese Verbindung liess sich auch durch Amadori-Umlagerung von N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin oder aus Anthranilsäure und 4,6-Benzal-D-glucose durch Umlagerung des Glykosylamins und hydrolytische Abspaltung des Benzalrestes synthetisieren, aber nur papierchromatographisch nachweisen (51). Es sollte versucht werden, diese Verbindung in grösseren Mengen rein, wenn möglich kristallin darzustellen, um erstens Aussagen über die Stabilität machen zu können und zweitens im Wachstumstest prüfen zu können, ob sie Tryptophan in der Biosynthese bei geeigneten Mikroorganismen ersetzen kann.

Da die Umlagerung des schon von Irvine und Gilmour (37) beschriebenen N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamins, wie schon bekannt, nicht zum gewünschten Ziel führt, sollten zunächst substituierte Zucker zur Amadori-Umlagerung eingesetzt werden, deren Substituenten unter milden Bedingungen abspaltbar sind. Deshalb wurde 6-O-Trityl-D-glucose eingesetzt, da der Tritylrest sowohl mit HBr/Eisessig bei0° als auch hydrogenolytisch leicht zu entfernen ist. Aus Anthranilsäure und 6-O-Trityl-D-glucose, die nach der Vorschrift von Helferich, Moog und Jürgen (28) hergestellt wurde, erhielt man durch Erhitzen in Methanol oder Aethanol nach der üblichen Methode meist gelb bis braun gefärbte Reaktionslösungen, aus denen

nur Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden konnte.

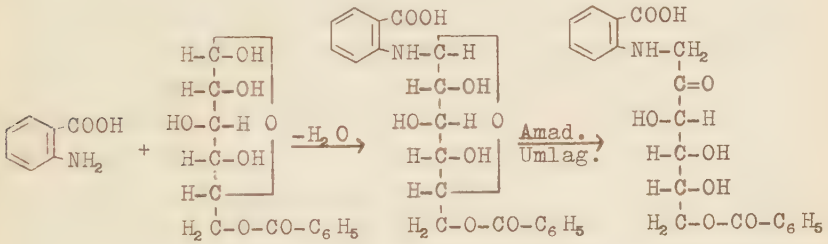


Beim Erwärmen in Butanol trat sogar Amadori-Umlagerung ein, wie durch die Reaktion mit o-Dinitrobenzol nachgewiesen wurde. Bringt man aber eine benzolische Lösung von Anthranilsäure und 6-O-Trityl-D-glucose kurz zum Sieden, so erstarrt das Reaktionsgemisch nach einigen Minuten zu einer Gallerte, die sich sehr schlecht filtrieren lässt. Das gesuchte N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin liess sich daraus in etwa 60-proz. Ausbeute als weisses, mikrokristallines Pulver mit dem Zersetzungspunkt von 147-148° isolieren. Es fällt mit einem halben Mol Kristallwasser aus, dass sich auch durch Trocknen über Phosphorpentoxyd in der Trockenpistole nicht entfernen liess. Die Verbindung ist labil und färbt sich schon nach einigen Tagen, vor allem unter Lichteinwirkung, braun.

Bei dem Versuch, dieses Glykosylamin umzulagern, zeigte es sich, dass die Huminstoffbildung bei weitem schneller verlief als die Amadori-Umlagerung. Die Reaktionslösungen wurden selbst nach kurzem Erhitzen in Pyridin/Eisessig tiefbraun, und es liess sich nur Ausgangsmaterial isolieren. Nach längerem Erhitzen konnte zwar mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung eine erhöhte Bildung an Amadori-Verbindung nachgewiesen werden, aber nach dem Eindampfen im Vakuum blieben nur braune bis schwarze Schmieren zurück. Bei der Katalyse der Reaktion mit wasserfreier Oxalsäure in Dioxan zeigte sich ein ähnliches Bild, die Amadori-Umlagerung setzte aber später ein.

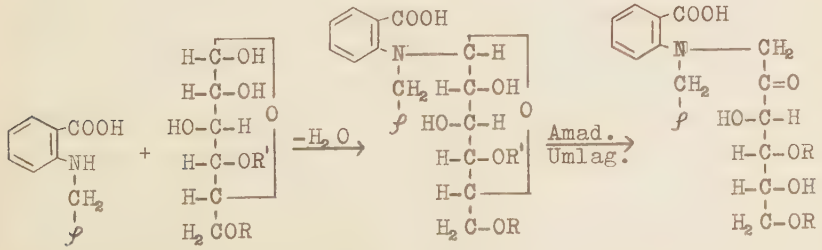
b) 6-O-Benzoyl-D-glucose.

Setzt man statt 6-O-Trityl-D-glucose 6-O-Benzoyl-D-glucose (101) ein, so tritt schon nach kurzem Erhitzen in Methanol Amadori-Umlagerung ein. Die Lösung färbt sich braun, und es lassen sich nur Harze isolieren. Die Reaktion mit o-Dinitrobenzol auf Amadori-Verbindungen ist positiv.



2. Versuche zur Herstellung von Amadori-Verbindungen N-substituierter Anthranilsäuren.

Da, wie schon früher vermutet wurde, die Amadori-Umlagerung von der Basizität des Aminstickstoffs abhängig ist (61, 68), sollte eine am Stickstoff substituierte Anthranilsäure eingesetzt werden, obwohl bekannt war, dass sekundäre Amine normalerweise schlechter umlagern als primäre (35,36). N-Benzylanthranilsäure schien besonders geeignet zu sein, da einmal der Benzylrest leicht hydrogenolytisch abspaltbar ist und zum anderen der mesomere Effekt des Phenylkerns durch die Methylengruppe geschwächt wird.

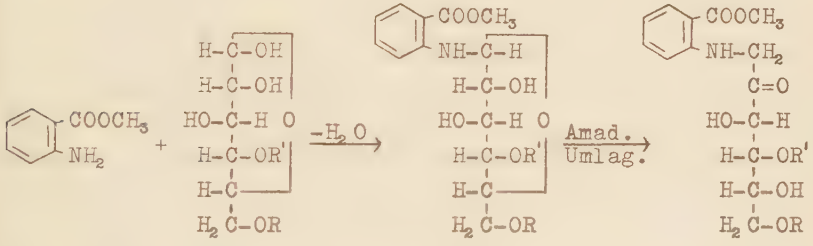


1. R,R' = CH-C6H5 , 2. R = H u. R' = H

Zunächst wurde versucht, nach den üblichen Methoden das Glykosylamin aus N-Benzylanthranilsäure und D-Glucose herzustellen. Aber selbst nach zweistündigem Erhitzen in Aethanol liess sich papierchromatographisch keine Anthranilsäure-Zukker-Verbindung nachweisen. Die Ausgangsprodukte konnten zum grössten Teil zurückgewonnen werden. Daher wurden die Komponenten gleich den Bedingungen einer Amadori-Umlagerung unterworfen, da es schon früher bei anderen Verbindungen gelungen war, ohne Isolierung des Glykosylamins die Amadori-Verbindung zu isolieren. Erhitzte man einen Tag in Pyridin/Eisessig oder bis zu 50 Stunden in Dioxan/Eisessig auf 100°, so färbten sich die Reaktionslösungen gelb bis dunkelbraun, und es konnte mit o-Dinitrobenzol die Bildung einer Amadori-Verbindung nachgewiesen werden. Aus den beim Abdampfen zurückbleibenden braunen Schmieren liess sich aber stets nur N-Benzylanthranilsäure und D-Glucose zurückgewinnen. Die Umlagerungstendenz ist also durch Substitution am Stickstoff der Anthranilsäure noch weiter verringert worden. Dies wurde dadurch bestätigt, dass N-Benzylanthranilsäure auch mit 4,6-Benzal-D-glucose, die nach Helferich und Porck (27) die Umlagerung ausserordentlich begünstigt, weder ein Glykosylamin bildet, noch ein Amadori-Produkt in isolierbaren Mengen liefert. Selbst nach 66-stündigem Erhitzen in Dioxan/Eisessig auf 100° liess sich noch Ausgangsmaterial zurückgewinnen. Führte man die Reaktion in mit Ammoniumchlorid gesättigtem Glykolmonomethyläther durch, so wurden im Papierchromatogramm drei Flecken gefunden, von denen zwei sowohl mit Anilinphthalat (67) auf Zucker als auch durch ihre Fluoreszenz auf N-Benzylanthranilsäure positiv reagierten, während der dritte mit N-Benzylanthranilsäure identisch war. Die Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid auf Amadori-Verbindungen fiel negativ aus, vermutlich, weil die Konzentration der Zuckerderivate zu gering war.

3. Versuche zur Herstellung von Amadori-Verbindungen aus Anthranilsäureestern.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass weder durch Variation des Zuckers noch durch Aenderung der Basizität des Aglykons die Amadori-Umlagerung einer Glucose-Anthranilsäure-Verbindung in der gewünschten Weise beeinflusst wird, blieb als letzte Möglichkeit noch, durch Aenderung der Wasserstoffionen-Konzentration das Säure-Basen-Verhältnis zu variieren. Daher wurde, um die Wirkung der Wasserstoffionen der Anthranilsäure auszuschalten, der Methylester der Anthranilsäure in die Reaktion eingesetzt.



1. R=H u. R'=H, 2. R'=H, R=-C(f)(f)(f), 3. R,R'=>CH-C6H5

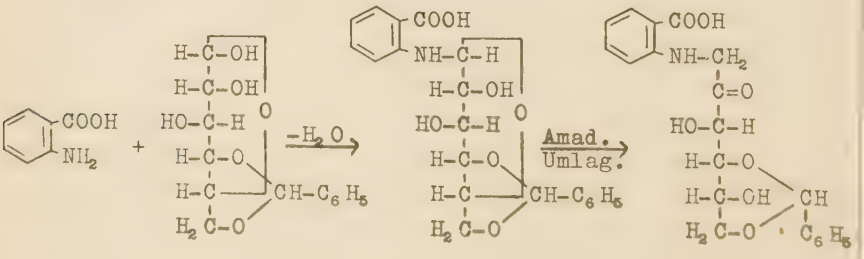
Durch Erhitzen von Anthranilsäure-methylester und D-Glucose in Aethanol konnte eine Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 155° erhalten werden, deren Analyse aber nur ungenaue Werte ergab. Versuchte man, das Rohprodukt umzukristallisieren, so sank der Schmelzpunkt, bis man schliesslich reine D-Glucose erhielt. Das Gleichgewicht der Glykosylaminbildung liegt also weitgehend auf der Seite der Ausgangsprodukte und lässt sich auch durch Erhöhung der Konzentration an Anthranilsäure-methylester nicht soweit verschieben, dass ein Zerfall in die Komponenten verhindert wird. Liess man die Reaktionslösung mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen, so färbte sie sich hellbraun, und es konnte mit o-Dinitrobenzol Amadori-Verbindung nachgewiesen werden. Unter schärferen Bedingungen war aber auch hier die Bildung von Huminstoffen so bevorzugt, dass eine Isolierung der Amadori-Verbindung un-

möglich war. Setzte man anstelle von D-Glucose 6-O-Trityl-D-glucose ein, so war nicht einmal ein unreines Glykosylamin isolierbar. Das gleiche war der Fall bei 4,6-Benzal-D-glucose als Zuckerkomponente. Selbst nach fünfstündigem Erhitzen in Dioxan/Eisessig oder in Dimethylformamid liess sich 4,6-Benzal-D-glucose zurückgewinnen.

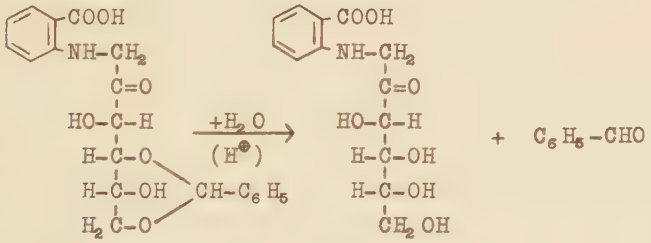
4. Versuche zur Herstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose.

a) Durch saure Hydrolyse.

Obwohl nach Befunden von Micheel und Schleppinghoff (55) Anthranilsäure nicht oder nur wenig zur Amadori-Umlagerung befähigt sein sollte, gelang es, aus Anthranilsäure und 4,6-Benzal-D-glucose sowohl das Glykosylamin als auch die Amadori-Verbindung in sehr guten Ausbeuten zu synthetisieren (51). Der von Helferich und Porck beobachtete, positive Einfluss der 4,6-Substitution des Zuckers scheint also die Schwächung des freien Elektronenpaares am Stickstoff der Anthranilsäure durch den mesomeren Effekt des substituierten Phenylkerns bei weitem zu überwiegen. Durch Hydrolyse in verdünnter Essigsäure war es auch gelungen (51), 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose papierchromatographisch nachzuweisen.



Durch Variation der Hydrolysebedingungen sollte nun versucht werden, sowohl die Bildung von Huminstoffen weitgehend zu vermeiden als auch die Zersetzung unter Bildung von Anthranilsäure und Hydroxymethylfurfurol (25) zu verhindern. Daher wurde zunächst mehrere Tage in Wasser auf 100° erhitzt. Wie zu vermuten war, trat keine Reaktion ein, und das Ausgangsmaterial konnte zurückgewonnen werden. Erhitzte man dagegen in mit Natriumacetat gepufferter Essigsäure mehrere Stunden auf 100°, so färbte sich nach einiger Zeit die Lösung braun, und gleichzeitig trat Geruch nach Benzaldehyd auf.



Papierchromatographisch liessen sich sowohl das gesuchte Amadori-Produkt als auch Anthranilsäure nachweisen. Aus den braunen bis schwarzen Abdampfrückständen konnte nur die Benzalfruktose-Verbindung isoliert werden. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, wenn man bis zu 10 Stunden in 0,05n Salzsäure auf 100° oder bis zu 4 Tagen in 2n Essigsäure auf 50° erwärmte. Da 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose in wässrigem Medium fast unlöslich ist und deshalb immer erst einige Zeit erhitzt werden musste, bis völlige Lösung eingetreten war, sollte versucht werden, durch Hydrolyse in äthanolischer Lösung kürzere Reaktionszeiten und damit geringere Huminstoffbildung und geringere Zersetzung zu erreichen. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose wurde dazu in Aethanol gelöst und die Lösung mit konzentrierter Salzsäure etwa auf einen pH von 1 gebracht, kurz aufgekocht und dann neutralisiert. Die Lösung war nur schwach gelb gefärbt, zeigte aber im Papierchromatogramm nur wenig 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-

D-fruktose neben sehr viel 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose. Erwärmte man 12 Stunden auf 40°, so wurde die Lösung dunkelgrün und roch stark nach Benzaldehyd. Aus den Papierchromatogrammen liess sich abschätzen, dass die Lösung mehr 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose als 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose enthielt. Der nach Neutralisieren und Abdampfen erhaltene, tiefbraune Sirup war nicht zur Kristallisation zu bringen. Versetzte man die neutralisierte Lösung mit Aether oder Chloroform, so fiel ein weisser Niederschlag aus, der aber beim Absaugen schlagartig braun und schmierig wurde, sobald er vom Lösungsmittel befreit war. Die gleichen Versuche wurden mit Schwefelsäure sowohl in wässrigem als auch in äthanolischem Medium durchgeführt. Es zeigten sich die gleichen Ergebnisse mit dem einzigen Unterschied, dass die wässrige Lösung tiefviolett und die äthanolische dunkelgrün wurde. Ein Versuch, die mit Bariumcarbonat neutralisierten Lösungen mit Aktivkohle zu entfärben, gelang nicht. Um eine weitere Zersetzung der gebildeten 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose während des Aufarbeitens zu verhindern, wurden die neutralisierten Lösungen lyophilisiert. Es gelang auch hier nicht, die glasigen Rückstände zu reinigen. Mit Hilfe einer Cellulosesäule konnten zwar an 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose angereicherte Fraktionen erhalten werden, aber während des Eindampfens und Lyophilisierens zersetzte sich die Amadori-Verbindung bereits wieder, sodass auch hier nur braune Schmieren anfielen.

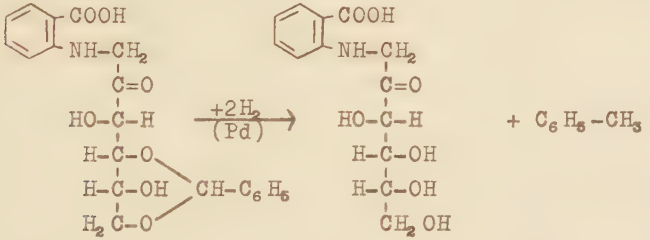
b) Durch Hydrogenolyse des Benzalrestes.

Als letzte Möglichkeit, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose herzustellen, blieb die nur wenig bekannte Methode, Benzalzucker durch Hydrogenolyse mit Palladium-Katalysatoren oder mit Raney-Nickel zu spalten (12,21,22,63).

In einer Mikrohydrierapparatur wurde mit $Pd/BaSO_4$ (5% Pd) in Methanol und Methanol/Essigester, mit Pd-Schwarz in Methanol, mit $Pd/BaSO_4$ (10% Pd) in Dioxan und mit Pd-Tierkohle in

Dioxan hydriert. Dabei konnte bei Zimmertemperatur keine Wasserstoff-Aufnahme beobachtet werden. Erwärmte man auf etwa 50°, so färbten sich die Lösungen teilweise leicht gelb, und es liess sich papierchromatographisch wenig 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose nachweisen. Eine quantitative Hydrierung gelang jedoch nicht.

Daraufhin wurde in einer normalen Hydrierapparatur nach der Vorschrift von O.Th.Schmidt (72) Palladiumchlorid in Methanol vorhydriert, das Lösungsmittel abdekantiert und eine methanolische Lösung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose zugegeben. Nach 30 Minuten war die theoretische Menge Wasserstoff verbraucht.



Beim Versetzen der eingeengten Lösung mit Wasser fiel wenig 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose aus. Das Papierchromatogramm des Filtrates zeigte nur noch einen einheitlichen Fleck von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose. Ueber hellgelb, grün und blau war die Lösung, die schon nach einigen Stunden begonnen hatte, sich zu verfärben, bereits nach einem Tag tiefviolett. Da angenommen werden konnte, dass diese Zersetzung von Spuren Salzsäure herrührte, wurde bei einer weiteren Hydrierung der Katalysator sehr sorgfältig mit absolutem Methanol gewaschen. Nach Zugabe der methanolischen Lösung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose wurde dann aber kein Wasserstoff mehr aufgenommen. Auch Erwärmen auf 50° konnte die Hydrierung nicht induzieren. Erst nach Zugabe von 10 ccm o,1n Salzsäure erfolgte Wasserstoffaufnahme, und in einer Stunde war die theoretische Menge verbraucht. Die Säure wurde sofort mit o,1n Natronlauge neutralisiert, restliche

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose wie oben entfernt und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der zurückbleibende Sirup war in Wasser sehr leicht löslich, in Methanol löslich und konnte aus der methanolischen Lösung mit Aethanol ausgefällt werden. Es konnte gezeigt werden, dass er selbst nach vier Tagen noch papierchromatographisch einheitlich aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose bestand.

Nach diesem etwas überraschenden Ergebnis sollte die Wirksamkeit der schon vorher eingesetzten Katalysatoren noch einmal überprüft werden. Es liess sich aber zeigen, dass 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose mit Pd-Tierkohle weder in Methanol noch in Methanol/0,1n Salzsäure hydriert wird.

c) Durch Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie.

Da die durch Hydrierung gewonnene 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose selbst nach mehrfachem Umfällen nicht in analysenreiner Form erhalten werden konnte, musste eine weitere, schonende Reinigungsmethode gesucht werden. Als besonders geeignet bot sich die von E.Stahl (79) entwickelte Dünnschichtchromatographie an, die es gestattet, in sehr kurzer Zeit und mit vorwiegend unpolaren Lösungsmitteln eine scharfe Trennung durchzuführen. Unreine 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose wurde auf Kieselgur-G-Schichten streifenförmig aufgetragen und mit Benzol/Methanol 6:1 aufsteigend entwickelt. Die Amadori-Verbindung hat unter diesen Bedingungen den R_F-Wert 0,98 und wurde zuerst mit Isopropanol und dann mit Methanol eluiert. Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel konnte 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose mit Aether als weisses, amorphes Pulver in analysenreiner Form gefällt werden, das sich im Exsikkator erst nach einigen Tagen braun färbte.

5. Versuche zur Darstellung von Salzen der 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

Um einerseits das umständliche Reinigungsverfahren umgehen zu können und zum anderen eine stabile und kristalline Stapelform von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose zu erhalten, wurde versucht, das Brucinsalz und das S-Benzylisothiuroniumsalz dieser Verbindung herzustellen. Während die Synthese des Brucinsalzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose durch Versetzen einer methanolischen Lösung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und Brucin mit Isopropanol und vorsichtiges Eindampfen im Vakuum nur zu einem untrennbaren Gemisch von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und dessen Brucinsalz führte, liess sich das kristalline S-Benzylisothiuroniumsalz von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose leicht auf die beschriebene Weise (85) darstellen. Dagegen konnte durch Umsetzen von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose mit S-Benzylisothiuroniumchlorid keine kristalline Substanz erhalten werden. Der Grund hierfür liegt wohl in dem vermutlich sehr tief liegenden Schmelzpunkt der zu erwartenden Verbindung. Da 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose bei 192-194° und das entsprechende S-Benzylisothiuroniumsalz bei 128-129° schmilzt, kann man einen Schmelzpunkt des Salzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose bei etwa 40° erwarten.

III. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose.

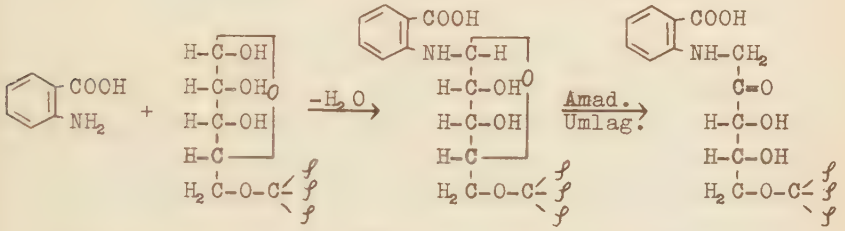
1. Aus Anthranilsäure und 5-O-Trityl-D-ribose.

Im Jahre 1958 gelang es Gibson und Mitarbeitern (24), im Medium von Tryptophan-Mangelmutanten von Aerobacter aerogenes eine Amadori-Verbindung nachzuweisen. Bei der im UV-Spektrum stark blau fluoreszierenden Verbindung musste es sich auf Grund ihrer Reaktionen und Spektren um 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose handeln. Ein synthetisches Vergleichspräparat konnte aber bisher nicht in reiner Form hergestellt werden. Versucht man nämlich, N-(o-Carboxyphenyl)-D-ribosylamin, N-(o-Carboxyphenyl)-L-ribosylamin, N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin oder N-(o-Carboxyphenyl)-L-arabinosylamin auf die übliche Weise umzulagern, so erhält man stets Lösungen, die zwar die Amadori-Verbindung enthalten, aus denen sie sich aber nicht isolieren lassen. Doy und Gibson konnten trotzdem einige Aussagen, zum Teil auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen, über die Eigenschaften dieser Verbindung machen, und zwar stellten sie fest, dass 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose in starker Säure rasch unter Freisetzung von Anthranilsäure und Abbau des Zuckerrestes zersetzt wird und auch in Alkalien extrem labil ist. Selbst das Eindampfen der Reaktionslösungen führte zur sofortigen Zersetzung. Spätere Versuche von Lingens und Hellmann (51), das Ribosylamin umzulagern, führten ebenfalls nicht zur Isolierung der Amadori-Verbindung.

Eine aussichtsreiche Möglichkeit, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose in reiner Form isolieren zu können, schien also nur darin zu liegen, durch Substitution des Zukkers vor allem in 5-Stellung die Amadori-Umlagerung zu erleichtern und die entstehende Amadori-Verbindung zu stabilisieren. Die Auswahl der Substituenten wurde dadurch begrenzt, dass sie später unter sehr milden Bedingungen wie Hydrogenolyse oder schonende Hydrolyse wieder abgespalten werden müs-

sen.

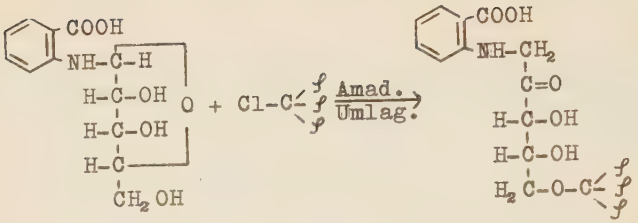
Da der Tritylrest sowohl hydrogenolytisch als auch mit HBr/Eisessig leicht entfernbar ist, wurde zunächst 5-O-Tritylribose, die nach einer Vorschrift von Bredereck u.a. (10) gut darstellbar ist, in die Reaktion eingesetzt.



Zunächst wurde versucht, auf die übliche Weise das Glykosylamin zu synthetisieren. Anthranilsäure und 5-O-Trityl-D-ribose wurden in Methanol, Aethanol oder Benzol gelöst und kurz zum Sieden gebracht. Dabei färbten sich die Lösungen jeweils hellgelb. Mit o-Dinitrobenzol konnte gezeigt werden, dass bereits Amadori-Umlagerung eingetreten war. Nach Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde aber nur Ausgangsmaterial zurückgewonnen. Erhitzte man dagegen in Methanol längere Zeit oder in Glykolmonomethyläther eine Stunde auf 100°, so färbten sich die Lösungen dunkelbraun und zeigten mit o-Dinitrobenzol eine starke Blaufärbung. Es war also auch hier bereits Amadori-Umlagerung eingetreten. Die nach dem Eindampfen erhaltenen, tiefbraunen Sirupe liessen sich nicht zur Kristallisation bringen.

2. <u>Aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-ribosylamin und Triphenylchlormethan.</u>

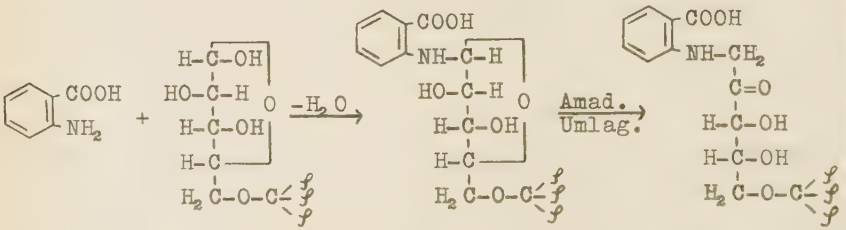
Nach Versuchen von Zeile und Kruckenberg (100) erhält man bei der Umsetzung von Piperidin-N-xylosid mit Triphenylchlormethan direkt die in 5-Stellung tritylierte Amadori-Verbindung. In Analogie dazu wurde N-(o-Carboxyphenyl)-D-ribosylamin mit Tritylchlorid umgesetzt.



Nach eintägigem Stehenlassen in Pyridin bei 37° hatte sich die Lösung hellbraun gefärbt. Die Tritylierung war nur zu einem geringen Teil erfolgt, da nach Zusatz von Wasser Triphenylcarbinol ausfiel. Mit o-Dinitrobenzol trat Blaufärbung ein. Es muss also Amadori-Umlagerung eingetreten sein. Nach Eindampfen des Lösungsmittels liessen sich aber nur teerige, huminartige Produkte isolieren.

3. Aus Anthranilsäure und 5-O-Trityl-D-arabinose.

Da Arabinosylamin und Ribosylamin sich in ihrer Konfiguration nur am C-Atom 2 unterscheiden, entsteht durch Amadori-Umlagerung aus ihnen dieselbe Aminoketose. Deshalb wurde anstelle von 5-O-Trityl-D-ribose auch 5-O-Trityl-D-arabinose, die sich nach der Vorschrift von Bristow und Lythgoe (11) herstellen liess, in die Reaktion eingesetzt.



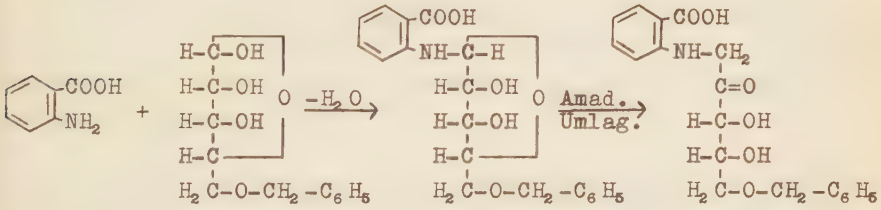
Dabei ergaben sich die gleichen Ergebnisse wie unter 1., das heisst, die Reaktion auf Amadori-Verbindungen verlief positiv, es liess sich aber kein kristallines Derivat isolieren.

Deshalb wurde auch hier in Analogie zu den Versuchen von Zeile und Kruckenberg (100) N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin mit Tritylchlorid umgesetzt. Aequimolare Mengen des

Glykosylamins und Tritylchlorid wurden in Pyridin gelöst und 15 Stunden bei 37° bzw. bei 40-45° stehengelassen. Dabei wurde die Lösung hellbraun. Mit o-Dinitrobenzol liess sich die Bildung von Amadori-Verbindung nachweisen, nach Aufarbeiten der Reaktionslösung konnte aber nur Ausgangsmaterial kristallin isoliert werden.

4. Aus Anthranilsäure und 5-O-Benzyl-D-ribose.

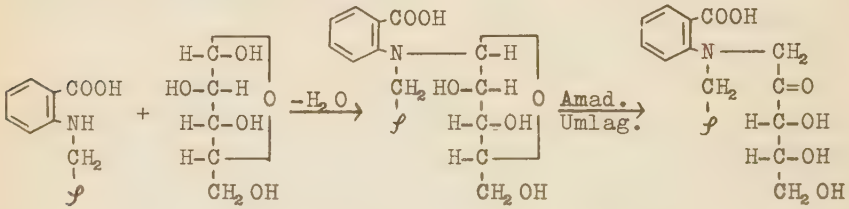
Aehnlich wie der Tritylrest ist auch der Benzylrest unter sehr schonenden Bedingungen hydrogenolytisch abspaltbar. Er bietet ausserdem den Vorteil, nicht so stark hydrolyseempfindlich zu sein. Aus diesen Gründen wurde 5-O-Benzyl-D-ribose, die nach Kenner, Taylor und Todd (39) zugänglich ist, mit Anthranilsäure umgesetzt.



Nach kurzem Aufkochen der Komponenten in Aethanol trat bereits starke Braunfärbung ein, und mit o-Dinitrobenzol erhielt man eine intensive Blaufärbung. Im Dünnschichtchromatogramm konnte allerdings nur ein schwacher Fleck beobachtet werden, der fluoreszierte und mit Anilinphthalat positiv reagierte. Nach mehrtägigem Stehenlassen von Anthranilsäure und 5-O-Benzyl-D-ribose in Aethanol bei 4° war keine nennenswerte Reaktion eingetreten. Die Umlagerung des 5-O-Benzylderivates scheint also schneller zu verlaufen als die der unsubstituierten Ribose, das Amadori-Produkt aber labiler zu sein, sodass sehr rasch Bildung von Huminstoffen eintritt.

5. Aus D-Arabinose und N-Benzylanthranilsäure.

In den bisher beschriebenen Versuchen konnte festgestellt werden, dass bei Pentosen die Amadori-Umlagerung anscheinend schneller verläuft als bei den Hexosen, dafür aber auch eine grössere Neigung zur Bildung von Huminstoffen besteht. Es schien daher aussichtsreicher zu sein, N-Benzylanthranilsäure und D-Arabinose mit dem Ziel in die Reaktion einzusetzen, ein stabiles Amadori-Produkt zu erhalten, das sich unter schonenden Bedingungen in 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose überführen lässt, da bei den Hexosen die analoge Umlagerung, wie schon gezeigt wurde, nur in geringem Masse erfolgt.

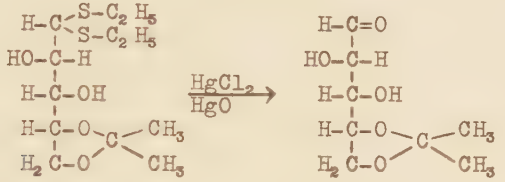


Erhitzte man die Komponenten in Methanol/Wasser einige Minuten auf 100° und liess sie dann zwei Wochen bei 50-80° stehen, so hatte sich zwar auch hier die Reaktionslösung braun gefärbt, und es trat mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung eine Blaufärbung ein, aber es liess sich papierchromatographisch feststellen, dass fast ausschliesslich die Ausgangsprodukte in der Reaktionslösung enthalten waren.

6. Versuche zur Herstellung von 4,5-Monoaceton-D-arabinose.

Im Gegensatz zur Glucose und zu den anderen Hexosen sind von Ribose und Arabinose keine geeigneten, das heisst, in 3,5-Stellung substituierten Kondensationsprodukte mit Aldehyden oder Ketonen bekannt. Um aber auch diesen Verbindungstyp in die Reaktion einsetzen zu können, wurde versucht, 4,5-Monoaceton-D-arabinose zu synthetisieren, da Isopropylidenderivate von Zuckern normalerweise schon unter äusserst

milden Bedingungen hydrolytisch gespalten werden. Es schien leicht möglich zu sein, diese Verbindung aus 4,5-Monoaceton-D-arabinose-diäthylmercaptal, das nach Zinner, Rembarz und Klöcking (102) aus Arabinose-diäthylmercaptal gut zugänglich ist, durch Abspaltung der Mercaptalreste herzustellen.



Aber selbst nach sehr schonender Durchführung der Reaktion, die bei Zimmertemperatur mit $HgCl_2$ und HgO durchgeführt wurde und anschliessender Behandlung mit Ionenaustauschern zur Entfernung der Hg-Ionen, konnte nur Arabinose isoliert werden. 4,5-Monoaceton-D-arabinose scheint demnach so hydrolyseempfindlich zu sein, dass sogar die, nur kurzzeitig während der Reaktion auftretende Säure ausreicht, um den Isopropylidenrest abzuspalten.

7. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose durch präparative Dünnschichtchromatographie.

Da alle Versuche, ein Derivat von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose in reiner und kristalliner Form, wie zum Beispiel 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose, zu erhalten, fehlgeschlagen waren, wurde auch hier die Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie angestrebt, obwohl kein weitgehend einheitliches Ausgangsmaterial vorlag wie im Falle der 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose, sondern ein Gemisch, das schätzungsweise nur etwa 10-30% der Amadori-Verbindung neben Anthranilsäure, Glykosylamin und Huminstoffen enthielt. Als Ausgangsmaterial wurde N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin benutzt, das in Glykolmonomethyläther umgelagert wurde. Die Trennung erfolgte aufsteigend an Kieselgur-G-Platten mit

dem Fliessmittelgemisch Benzol/Methanol 12:1. Die Amadori-Verbindung hatte dann den R_F-Wert 0,9, während das Arabinosylamin bei R_F 0,5 und die Anthranilsäure bei R_F 1,0 lag. Eluiert wurde mit Isopropanol und Methanol, und man erhielt nach dem Eindampfen durch Fällen mit Aether ein weisses, amorphes Pulver, das sich vor allem an der Luft erheblich schneller braun färbte als die entsprechende Amadori-Verbindung der Fruktose.

IV. Austestung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose an Tryptophan-Mangelmutanten und an tryptophanabhängigen Mikroorganismen.

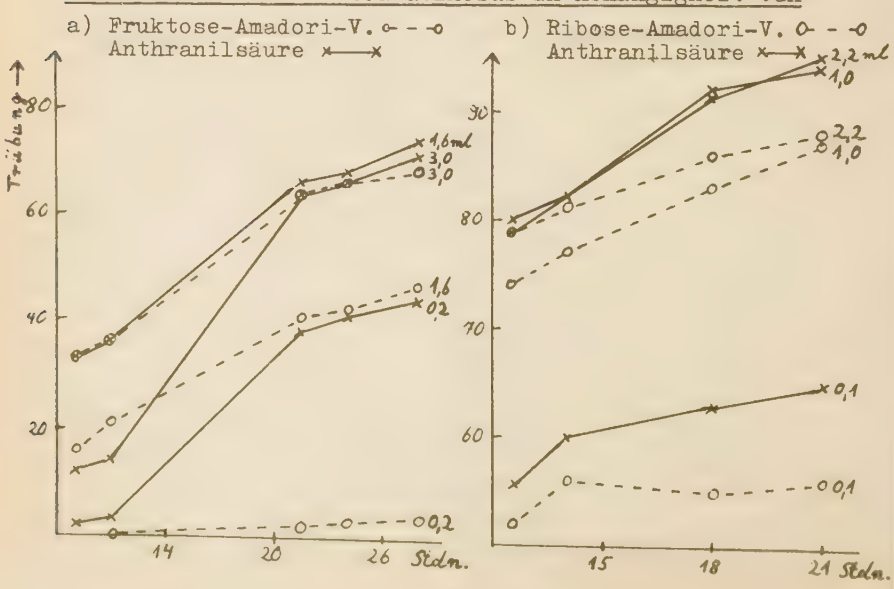
Um zu prüfen, ob 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose reelle Zwischenglieder der Tryptophan-Biosynthesekette oder nur Kunstprodukte sind, die durch Entphosphorylierung der entsprechenden Phosphorsäureester entstehen, wurden diese beiden Verbindungen an die Tryptophan-Mangelmutanten try-2, try-8 und try-14 von Salmonella typhimurium, DX 12 und 1001-5c von Saccharomyces cerevisiae und an die auf Tryptophanzufuhr angewiesenen Organismen Lactobacillus arabinosus 17-5 und Streptococcus faecalis 9790 verfüttert. Bei den Mutanten handelt es sich um solche, die entweder mit Anthranilsäure wachsen, deren genetischer Block also vor der Anthranilsäure liegt (try-8 und 1001-5c), oder solche, die Anthranilsäure (try-2) bzw. Fruktosylamin (try-14) akkumulieren, die also zwischen Anthranilsäure und Indolylglycerin blockiert sind.

Für die verschiedenen Stämme wurden Nährmedien verwendet, die nach Zusatz von 10 γ L-Tryptophan/ml Wachstum, ohne L-Tryptophan jedoch kein Wachstum ermöglichen. 5 ml der Nährlösung wurden mit jeweils 10,3 γ/ml Anthranilsäure, 22,5 γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose/ml oder 20,2 γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose/ml komplettiert, mit atwa 10^4 Zellen/ml angeimpft und 24 Stunden bebrütet. Nur bei der Mutante try-8 von Salmonella typhimurium und bei Lactobacillus arabinosus konnte in allen drei Fällen eine Trübung beobachtet werden, während alle anderen Versuche negativ ausfielen. Die quantitative Austestung des Wachstumsversuches bei Lactobacillus arabinosus zeigte, dass die beiden Amadori-Verbindungen gegenüber Anthranilsäure nur etwas verzögert verbraucht wurden. Dieser Befund kann darauf hindeuten, dass die Amadori-Verbindungen zerfallen und dann die Anthranilsäure das Wachstum verursacht. Da alle anderen einge-

setzten Mikroorganismen weder mit Anthranilsäure noch mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose oder 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose gewachsen waren, lässt sich aus den Wachstumsversuchen nicht mit Sicherheit schliessen, ob die Amadori-Verbindungen direkt oder erst nach Zerfall wachstumswirksam sind.

Deshalb sollte geprüft werden, ob nach der Bebrütung die gesamte, eingesetzte Amadori-Verbindung zerfallen war. Die Lösungen wurden zentrifugiert, eingedampft und die Rückstände in wenig Aethanol aufgenommen. Zur Kontrolle bebrütete man parallel nicht angeimpftes Medium mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose bzw. Anthranilsäure 24 Stunden bei 37° und arbeitete in gleicher Weise auf. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab folgendes, überraschendes Ergebnis: In allen Fällen konnte eine Amadori-Verbindung nachgewiesen werden, aber auch Anthranilsäure hatte mit der im Medium vorhandenen Glucose ein Umlagerungsprodukt gebildet, das nach seinem chromatographischen Verhalten mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose identisch sein muss.

Wachstumskurven bei L.arabinosus in Abhängigkeit von



V. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat.

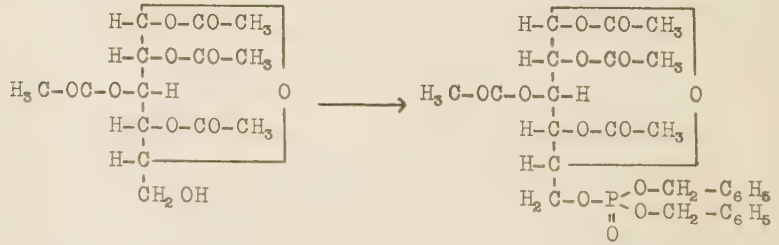
Da mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass die Synthese des Tryptophans in der lebenden Zelle nicht über 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose bzw. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose, sondern über deren in 6- bzw. 5-Stellung phosphorylierten Derivate verläuft, sollten auch diese Verbindungen synthetisiert und wenn möglich in reiner Form dargestellt werden. Obwohl die Phosphorsäureester im Wachstumsversuch aller Voraussicht nach keine Wirksamkeit zeigen würden, da die Zellmembran in den allermeisten Fällen für Phosphorsäureester undurchlässig ist, war es wünschenswert, die reinen Verbindungen für Fermentversuche und als Vergleichssubstanzen zur Verfügung zu haben. Bei dem Versuch, aus Glucose-6-phosphorsäure oder deren Natriumsalz mit Anthranilsäure das Glykosylamin herzustellen, zeigte sich, dass in Aethanol oder Methanol nach längerem Kochen Braunfärbung eintritt und mit o-Dinitrobenzol geringe Mengen Amadori-Verbindung nachzuweisen sind. Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn man die Komponenten mehrere Tage bei Zimmertemperatur in Aethanol stehen liess. Chromatographisch konnte kein Glykosylamin nachgewiesen werden. Erhitzte man dagegen Glucose-6-phosphat und Anthranilsäure mehrere Stunden in Pyridin/Eisessig oder noch besser in Dioxan/Eisessig, so färbte sich die Lösung zwar stärker braun, und es liess sich auch auf diese Weise kein Glykosylamin nachweisen, aber die Reaktion mit o-Dinitrobenzol auf Amadori-Verbindungen fiel sehr stark positiv aus. Trotzdem liess sich auch hier durch übliches Aufarbeiten kein 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat in reiner Form isolieren. Es sollte daher versucht werden, durch Einsetzen von substituierten Phosphorsäureestern die Amadori-Umlagerung zu erleichtern und die Amadori-Verbindung gleichzeitig zu stabilisieren. Ausserdem hätte man bei di-

substituierten Phosphorsäureestern den Vorteil, nicht mit der freien Phosphorsäure oder deren Salzen arbeiten zu müssen, was erfahrungsgemäss meist schwierig ist. Da auch hier die Substituenten leicht entfernbar sein müssen, wurde zunächst versucht, Glucose-6-dibenzylphosphat herzustellen. Die Synthese dieser Verbindung wurde auf zwei verschiedenen Wegen angestrebt:

1. Umsetzung von 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose mit Dibenzylphosphorylchlorid und nachfolgende Entacetylierung und
2. Umsetzung von D-Glucose mit Dibenzylphosphorsäure in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid als Katalysator in Pyridin, wobei in erster Linie die primäre Hydroxylgruppe der Glucose verestert werden sollte.

1a. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat.

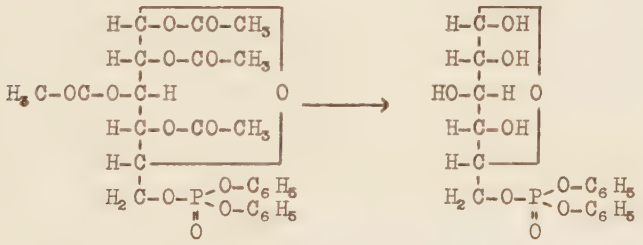
1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose wurde analog der Vorschrift zur Herstellung von 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat (44) in Pyridin mit Dibenzylphosphorylchlorid umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man aber nur ein sirupöses Gemisch aus Tetraacetylglucose und dem gewünschten 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-dibenzylphosphat, das sich nicht zur Kristallisation bringen liess und auch nicht anderweitig gereinigt werden konnte.



Trotzdem wurde versucht, dieses Gemisch mit Natrium-methylat zu entacetylieren, wobei aber nur Glucose und anorganische Salze isoliert werden konnten.

1b. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat.

Da die Diphenylester der Phosphorsäure normalerweise bessere Kristallisationseigenschaften haben und ausserdem bei Synthesen höhere Ausbeuten liefern als die entsprechenden Dibenzylester, wurde versucht, das gut zugängliche 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat zu entacetylieren, da angenommen werden konnte, dass die oben erwähnte Synthese der gewünschten Amadori-Verbindung auch mit dem Diphenylesterderivat gelingen müsste. Diese Synthese hätte aber wahrscheinlich nur den Wert eines Analogiebeispieles gehabt, da sich aller Voraussicht nach die beiden Phenylgruppen nicht unter genügend schonenden Bedingungen abspalten lassen würden.



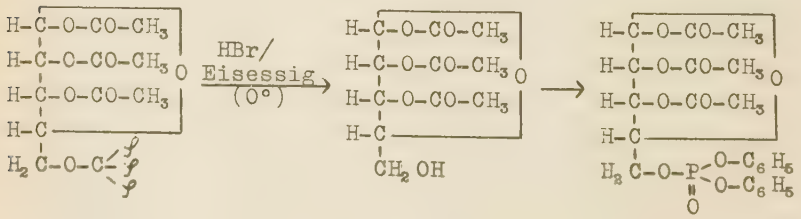
Beim Versuch, 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat nach Zemplen mit Natrium-methylat zu entacetylieren, erhielt man nach dem Abdampfen des Lösungsmittels einen Sirup, der deutlich nach Phenol roch. Chromatographisch konnte nur noch Glucose-6-phosphorsäure nachgewiesen werden. Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn man in Acetonlösung mit 0,1n Natronlauge zu entacetylieren versuchte. Um den Verlauf der Hydrolyse genauer untersuchen zu können, wurde deshalb unter pH-Kontrolle sehr vorsichtig titriert. Bei pH 11 als Maximum wurden in einer gleichmässig verlaufenden Zeitkurve genau 6 Aequivalente verbraucht, also sämtliche Acetyl- und Phenylgruppen verseift. Brach man die Titration nach Zugabe von 4 Aequivalenten Natronlauge ab, so liessen sich chromatographisch sowohl Tetraacetylglucose-6-diphenylphosphat als auch Glucose-6-phosphorsäure nachweisen.

Ausserdem trat Geruch nach Phenol auf. Es besteht also kein wesentlicher Unterschied zwischen der Verseifungsgeschwindigkeit der Acetyl- und der Phenylgruppen, sodass auf diese Weise keine partielle Abspaltung der Acetylgruppen möglich ist.

Deshalb wurde versucht, durch Einleiten von Ammoniak in eine Lösung von Tetraacetylglucose-6-diphenylphosphat in Aceton bzw. Dioxan eine Entacetylierung zu erreichen. Dabei ergab sich bei Aceton die Schwierigkeit, dass aldolartige Kondensationsprodukte entstanden, die sowohl den Zuckernachweis als auch die Isolierung der gewünschten Verbindung unmöglich machten. Dagegen konnte man nach einstündigem Einleiten von Ammoniak in eine Dioxanlösung von Tetraacetylglucose-6-diphenylphosphat das Ausgangsmaterial fast quantitativ zurückgewinnen, während nach siebenstündigem Einleiten Geruch nach Phenol auftrat und neben Tetraacetylglucose-6-diphenylphosphat chromatographisch wieder Glucose-6-phosphorsäure nachgewiesen werden konnte.

1c. Versuche zur Synthese von D-Ribose-5-diphenylphosphat.

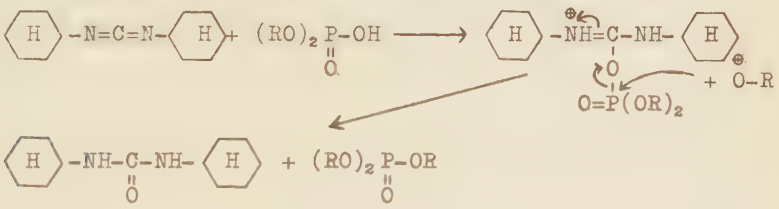
Eine analoge Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat scheiterte bereits an der Darstellung der 1,2,3-Tri-O-acetyl-D-ribose. Diese Verbindung sollte ähnlich wie die 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-glucose ausgehend von 5-O-Trityl-D-ribose über 1,2,3-Tri-O-acetyl-5-O-trityl-D-ribose, die nach Bredereck, Köthnig und Berger (10) zugänglich ist, und Abspaltung des Tritylrestes dargestellt werden.



Leider führte die Behandlung der 1,2,3-Tri-O-acetyl-5-O-trityl-D-ribose mit HBr/Eisessig bei 0° stets zur 2,3-Di-O-acetyl-anhydro-D-ribose, da neben dem Tritylrest auch eine Acetylgruppe abgespalten wurde.

2a. Versuche zur Veresterung von D-Glucose mit Dibenzylphosphorsäure.

In den letzten Jahren wurde eine schonende und elegante Methode entwickelt, Phosphorsäuren mit Alkoholen zu verestern (13). Dabei wird Dicyclohexylcarbodiimid als Veresterungsmittel benutzt. Die Synthese verläuft ausgehend von Diesterphosphorsäuren und Dicyclohexylcarbodiimid über ein Enolphosphat des Harnstoffs, das direkt verestert wird.



Normalerweise ist ein grosser Alkoholüberschuss erforderlich, da sonst die Reaktion zur Bildung von Pyrophosphat ausweicht. Primäre Hydroxylgruppen werden bevorzugt verestert. Zunächst wurde versucht, Glucose oder N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin mit Dibenzylphosphorsäure umzusetzen. Dabei wurde so verfahren, dass man eine Lösung des Zuckers in Pyridin auf -5° kühlte, Dicyclohexylcarbodiimid zugab und dann eine Lösung von Dibenzylphosphorsäure in Pyridin sehr langsam zutropfen liess. Nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank wurde dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch untersucht. Es zeigte sich, dass in allen Fällen nur Spuren einer Zuckerphosphatverbindung gebildet worden waren und der eingesetzte Zucker fast quantitativ zurückgewonnen werden konnte.

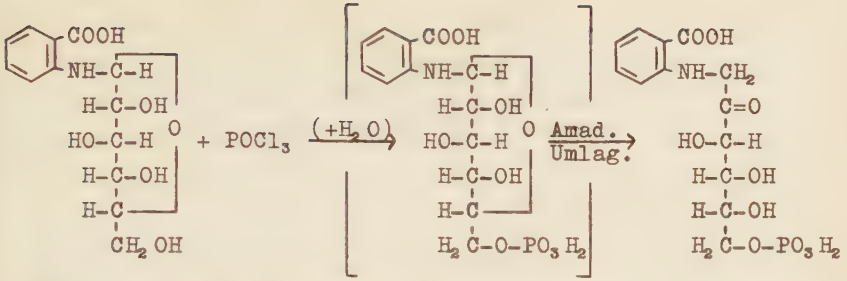
2b. Versuche zur Veresterung von D-Glucose und D-Arabinose mit Diphenylphosphorsäure.

Da, wie schon vorher beschrieben wurde, stets Schwierigkeiten bei der Synthese von D i b e n z y l phosphorsäureestern auftreten, sollte auch hier die Reaktion mit D i p h e n y l phosphorsäure durchgeführt werden. Wie oben liess man bei -5° Glucose und Diphenylphosphorsäure in den Molverhältnissen 4:1 und 2:1 miteinander reagieren. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels wurde mit Aethanol fraktioniert kristallisiert und die Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur ein verschwindend kleiner Rest von zurückbleibendem Sirup, der nur noch wenig Glucose und vor allem Diphenylphosphorsäure enthielt, einen Flecken ergab, der sowohl mit Anilinphthalat auf Zucker als auch mit Ammoniummolybdat auf Phosphat positiv reagierte. Alle anderen Fraktionen bestanden aus reiner Glucose.

Die gleichen Ergebnisse erhielt man bei der Umsetzung von D-Arabinose mit Diphenylphosphorsäure im Verhältnis 3:1.

3. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat bzw. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin bzw. N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin und Phosphoroxychlorid.

Da man annehmen kann, dass Phosphoroxychlorid ähnlich wie Tritylchlorid weitgehend selektiv die primäre Hydroxylgruppe eines Zuckers verestert, wurde versucht, N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin mit Phosphoroxychlorid umzusetzen, um entweder zum phosphorylierten Glykosylamin oder wie bei der Umsetzung von N-Piperidino-xylosamin mit Tritylchlorid nach Zeile und Kruckenberg (100) direkt zur Amadori-Verbindung zu gelangen.



Dabei wurde generell so verfahren, dass man eine Lösung von Phosphoroxychlorid in Dioxan oder Pyridin sehr langsam in eine auf 0° gekühlte Lösung des Glykosylamins unter Rühren eintropfen liess, einige Stunden bei 0° weiterrührte, über Nacht im Eisschrank stehen liess und dann vorsichtig mit wenigen Tropfen Wasser hydrolysierte. Schon während des Zutropfens wurde die Lösung gelb und verfärbte sich dann nicht weiter. Am Boden des Reaktionsgefässes setzte sich eine ebenfalls gelbe, sirupöse Masse ab, die vorwiegend aus einer Mischung von Glykosylamin und anorganischem Phosphat bestand. Die papierchromatographische Untersuchung im System Butanol/Ammoniak ergab, dass sich in ganz geringen Mengen zwei neue Verbindungen mit den R_F-Werten 0,66 und 0,98 gebildet hatten, die aber in so geringer Konzentration vorlagen, dass sie nur an ihrer Fluoreszenz erkannt werden konnten, während Anilinphthalat und Ammoniummolybdat nicht reagierten. In den Reaktionsgemischen, die bei der Umlagerung von D-Glucose-6-phosphat bzw. D-Ribose-5-phosphat mit Anthranilsäure entstehen, konnten diese Verbindungen nicht nachgewiesen werden.

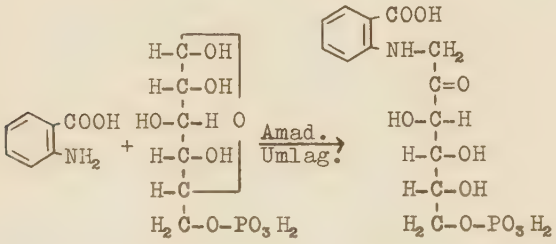
4. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat durch präparative Dünnschichtchromatographie.

a) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat.

Nachdem auf verschiedenen Wegen vergeblich versucht worden war, ein Derivat von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-

fruktose-6-phosphat herzustellen, aus dem der Substituent durch schonende Behandlung abgespalten werden konnte, blieb als letzte Möglichkeit, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat auf chromatographischem Wege in reiner Form zu gewinnen.

Ausgehend vom Dinatriumsalz der D-Glucose-6-phosphorsäure und Anthranilsäure bildete sich beim Erhitzen in Dioxan/Eisessig/Wasser ein tiefbraunes Reaktionsgemisch, das etwa 10-20% der Amadori-Verbindung enthielt.

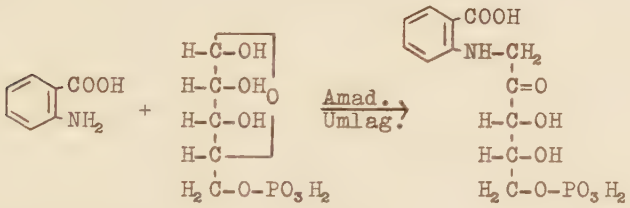


Zunächst wurde versucht, diese Lösung an einer Säule mit Kieselgur zu trennen. Dabei konnte Anthranilsäure mit Isopropanol zuerst eluiert werden. Mit einem Gemisch aus Isopropanol/Wasser 95:5 erhielt man Fraktionen, die stark an 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat angereichert waren, aber nach Einengen des Lösungsmittels stets viel Huminstoffanteile enthielten und nicht frei von Anthranilsäure waren.

Darauf wurde das oben erwähnte Reaktionsgemisch der präparativen Dünnschichtchromatographie an Kieselgur-G unterworfen. Nach Entwicklung und Eluierung mit Isopropanol/Wasser (R_F Fruktosephosphat-Amadori-Verbindung = 0,8) erhielt man eine chromatographisch reine Lösung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat, aber schon während des Eindampfens der Lösungsmittel trat Braunfärbung ein und nach etwa 30 Stunden war bereits die Hälfte der Amadori-Verbindung in Anthranilsäure und Huminstoffe zerfallen.

b) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat.

Aehnliche Ergebnisse erhielt man bei der präparativen, dünnschichtchromatographischen Reinigung eines Reaktionsgemisches, das durch Umlagerung des Natriumsalzes von D-Ribose-5-phosphat und Anthranilsäure in Pyridin/Eisessig/Wasser erhalten wurde und ebenfalls etwa 10-20% der Amadori-Verbindung enthielt.



Nach Entwicklung im System Isopropanol/Benzol/Wasser 6:3:1 (R_F Ribulose-Amadori-Verbindung = 0,85) und Eluierung mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch konnte ebenfalls eine kurzzeitig einheitliche Lösung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat erhalten werden. Die Amadori-Verbindung zersetzte sich bereits nach 3-4 Stunden, also wesentlich schneller als das entsprechende 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat. Auch ein Versuch, die Amadori-Verbindung durch Neutralisation zu stabilisieren, gelang nicht. Auch bei pH 7 zerfiel die Amadori-Verbindung so schnell, dass eine Isolierung in reiner Form nicht möglich war.

VI. Versuche zur Synthese von Amadori-Verbindungen mit verschiedenartig substituiertem Zuckeranteil.

1. Versuche zur Herstellung von Kondensationsprodukten aus D-Glucose und Aldehyden. Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-4,6-äthyliden-D-glucosylamin und Versuche zur Herstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-äthyliden-D-fruktose.

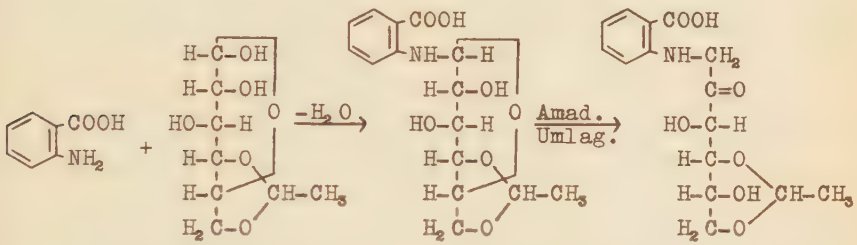
Wie Helferich und Porck (27) zuerst beobachteten und später vielfach bestätigt wurde, begünstigt 4,6-Benzal-D-glucose als Zuckerkomponente die Amadori-Umlagerung in ganz besonderem Masse. Die Gründe hierfür sind bisher nicht bekannt. Der Einfluss der Benzalgruppe kann aber auf drei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden:

1. sterische Beeinflussung,
2. Verschiebung der Elektronenverteilung,
3. Stabilisierung des Endproduktes.

Bei Punkt 1. und 2. müsste als reaktionseinleitender Schritt eine Lockerung der Halbacetalbindung erfolgen, wodurch die Enolisierung und damit auch die Umlagerung erleichtert wird. Eine Entscheidung, welche der drei Möglichkeiten zutrifft, könnte möglich sein, wenn man andere 4,6-substituierte Glucosen in die Reaktion einsetzt, vor allem aber solche, die in ihrer Raumausfüllung gleich, in ihrer elektronenschiebenden Wirkung aber verschieden, oder solche, die in ihrer Raumausfüllung verschieden, in ihrer elektronenschiebenden Wirkung aber gleich sind. Für den ersten Fall sollten p- und m-Nitrobenzaldehyd und Anisaldehyd, im zweiten aber die aliphatischen Aldehyde wie Acetaldehyd, n-Propionaldehyd, Isobutyraldehyd und 2-Aethylbutanal eine Entscheidung bringen können.

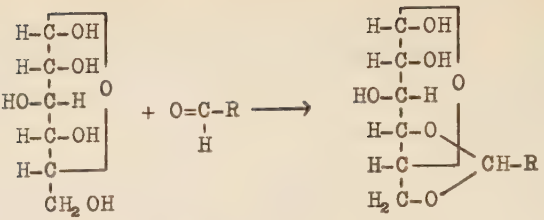
Von allen diesen Derivaten war bisher nur die 4,6-Aethyliden-D-glucose in der Literatur beschrieben, deren Synthese nach Hockett, Collins und Scattergood (33) ähnlich der der 4,6-Benzalglucose zu guten Ausbeuten führt. Setzt man die

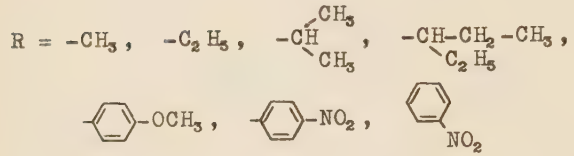
4,6-Aethyliden-D-glucose unter denselben Bedingungen mit Anthranilsäure um wie die 4,6-Benzalglucose, so lässt sich das 4,6-Aethyliden-D-glucosylamin ohne grosse Schwierigkeiten und in guter Ausbeute herstellen.



Versucht man aber, dieses in Glykolmonomethyläther bei 100° umzulagern, so tritt schon nach verhältnismässig kurzer Zeit Braunfärbung ein. Unterbricht man die Reaktion nach einer Stunde, so lässt sich mit o-Dinitrobenzol zwar die Amadori-Verbindung nachweisen, nach Aufarbeiten ist aber nur Ausgangsmaterial zu isolieren. Nach einstündiger Reaktion bei 80° ist die Braunfärbung zwar bedeutend geringer und die Blaufärbung mit o-Dinitrobenzol fast ebenso stark, aber es konnte auch hier nur das Glykosylamin in etwa 80-proz. Ausbeute zurückgewonnen werden. Erhitzt man drei Stunden auf 100°, so haben sich schon soviel Huminstoffe gebildet, dass nach Eindampfen der Lösungsmittel nur ein schwarzer Teer zurückbleibt, während nach fünfstündigem Erwärmen auf 80° noch etwa 40% Ausgangsmaterial isoliert werden konnten. Versuche, in Pyridin/Eisessig umzulagern, führten zum gleichen Ergebnis. Aus der Reaktion gegenüber Triphenyltetrazoliumchlorid liess sich abschätzen, dass 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-äthyliden-D-fruktose stärker reduzierend wirkt als 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose. Ob dies irgendeinen Einfluss auf die Stabilität der Amadori-Verbindung hat, kann noch nicht gesagt werden.

Der Einsatz der anderen Zucker-Aldehyd-Kondensationsprodukte scheiterte daran, dass sich diese Verbindungen nicht herstellen liessen.





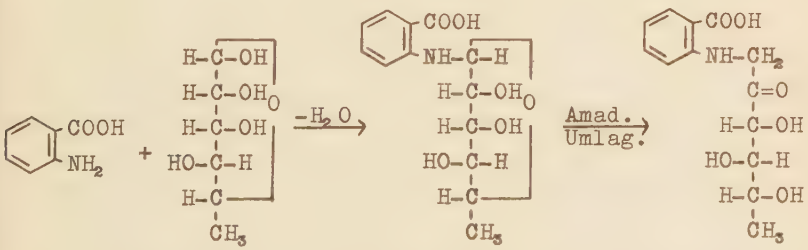
Liess man n-Propionaldehyd oder Isobutyraldehyd im Aldehyd als Lösungsmittel mit konzentrierter Schwefelsäure oder mit wasserfreiem Zinkchlorid als Kondensationsmittel und auch unter Zusatz von wasserfreiem Kupfersulfat als wasserentziehendem Mittel miteinander reagieren, so bildete sich schon bald ein Kristallbrei von polymeren Aldehyden, der bei erhöhter Temperatur zwar wieder in Lösung ging, aber unter diesen Bedingungen nicht wieder gespalten wurde, wie es beim Paraldehyd der Fall ist. Ein Zucker-Aldehyd-Kondensationsprodukt konnte wie auch beim 2-Aethylbutanal, das auf ähnliche Weise umgesetzt wurde, in keinem Falle nachgewiesen werden. Anisaldehyd wurde mit D-Glucose sowohl in äquimolaren Mengen als auch im Verhältnis Zucker:Aldehyd 4:1 umgesetzt. Als Lösungsmittel wurden der Aldehyd selbst, Aethanol und Dioxan, als Katalysatoren Zinkchlorid und konzentrierte Schwefelsäure und als wasserentziehendes Mittel Natriumsulfat verwendet. Die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur, 40° und 100° durchgeführt. In keinem Fall konnte ein Kondensationsprodukt isoliert werden. p- und m-Nitrobenzaldehyd waren bei Zimmertemperatur selbst nicht als Lösungsmittel zu verwenden. Rührte man aber mehrere Stunden bei 60-100° mit Zinkchlorid oder Schwefelsäure als Katalysatoren, so erhielt man braune Schmieren, die sich nur schwer in Dioxan oder Aceton lösten und beim Abkühlen zu einer steinharten Masse erstarrten. Es liessen sich keine Kristalle isolieren. Schliess-

lich wurde versucht, Glucose und m-Nitrobenzaldehyd in Dioxan mit konzentrierter Schwefelsäure als Katalysator im Soxhlet mehrere Tage mit Calciumchlorid als wasserentziehendem Mittel zu kochen, wie es von Bredereck (103) mit Erfolg bei der Umsetzung von Furfurol mit Glucose durchgeführt worden war. Auch auf diese Weise konnte kein 4,6-Kondensationsprodukt erhalten werden.

2. Versuche zur Herstellung einer Amadori-Verbindung aus Rhamnose und Anthranilsäure.

Da vermutet wurde, dass die Befähigung eines Glykosylamins zur Amadori-Umlagerung weitgehend von der Leichtigkeit abhängt, mit der der Halbacetalring des Zuckers geöffnet wird, und da die Oeffnung des Ringes durch Substitution in 4,6- oder in 6-Stellung beeinflusst werden kann (30), sollte ein Zucker untersucht werden, der in 6-Stellung zwar verändert ist, dessen Substituent aber keinerlei sterischen Einfluss auf die Bildung eines Halbacetal- oder Halbketalringes haben dürfte. Hierzu schien der 6-Desoxyzucker Rhamnose geeignet zu sein.

Tatsächlich lässt sich durch kurzes Erhitzen in Aethanol aus Anthranilsäure und Rhamnose-hydrat das N-(o-Carboxyphenyl)-rhamnosylamin in 89-proz. Ausbeute darstellen. Führt man die Reaktion einen Tag bei 50-60° in Dioxan durch, so ist die Ausbeute sogar fast quantitativ.



Im Gegensatz zum N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin ist dieses Glykosylamin sehr stabil. Versucht man

aber, es in Pyridin/Eisessig, in Dioxan/Eisessig oder in Dimethylformamid umzulagern, so zeigen sich dieselben Erscheinungen wie bei der Tritylverbindung. Durch längeres Erhitzen wird zwar mehr Amadori-Verbindung gebildet, wie sich mit Hilfe der o-Dinitrobenzolreaktion abschätzen liess, da aber die Bildung von braunen Sekundärprodukten ungleich schneller verlief, liess sich das Umlagerungsprodukt nicht isolieren.

Experimenteller Teil

Die Papierchromatogramme wurden auf Whatman-Papier Nr. 4 und Macherey u. Nagel Nr. 60 ausgeführt.

Als Fliessmittel kamen n-Butanol/3% Ammoniak 1:1 und Benzol/Isopropanol/Wasser 1:5:1 zur Anwendung.

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden ausschliesslich an Schichten aus Kieselgur-G durchgeführt.

1. N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin.

0.5 g (0.0012 Mol) 6-O-Trityl-D-glucose (28) und 0.18 g (0.0013 Mol) Anthranilsäure wurden in 20 ccm Benzol gelöst und zum Sieden gebracht. Nach 5-10 Min. erstarrte der Kolbeninhalt zu einer dicken Gallerte. Nach Filtration und Umkristallisation aus absol. Aethanol erhielt man 0.6 g (77% d.Th.) weisses, mikrokristallines Pulver. α_D^{22}: -1.2° (8 Min.) --> + 4.7° (24 Stdn., c=1, in Pyridin).
Schmp. 147-148° (Zers.).

$C_{32}H_{31}NO_7 \cdot 1/2H_2O$ (550.6)

Ber.	C 69.80	H 5.86	N 2.54
Gef.	C 69.75	H 5.76	N 2.32

Einw. 4.198 mg CO_2 10.73 mg H_2O 2.16 mg
Einw. 4.554 mg 0.093 ccm N_2 26/756

Durch Erhitzen in Methanol, Aethanol oder n-Butanol wurden nur braune Schmieren erhalten, die alkalische o-Dinitrobenzollösung blau färbten und nach Aufnehmen in Benzol wenig Ausgangsmaterial lieferten.

2. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-6-O-trityl-D-fruktose.

a) 0.42 g (0.001 Mol) 6-O-Trityl-D-glucose und 0.14 g (0.001 Mol) Anthranilsäure wurden in 5 ccm Dioxan und in 5 ccm Dioxan, dem eine Spur wasserfreier Oxalsäure zugesetzt war, gelöst und 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Die dunkelbraunen

Lösungen reagierten mit o-Dinitrobenzol stark positiv und ergaben nach Eindampfen i. Vak. bei 35-4o° schwarze, harzartige Sirupe, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten.

b) Je o.37 g (o.ooo5 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin wurden

1) in 5 ccm Dioxan/Oxalsäure 2 Stdn. auf loo°,
2) in 5 ccm Glykolmonomethyläther 1 Stde. auf loo°,
3) in 5 ccm Pyridin + o.5 ccm Eisessig 15 Min. auf loo°,
4) in 5 ccm Pyridin + o.5 ccm Eisessig 2 Stdn. auf loo°

erhitzt. Der Test mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung verlief positiv, und im Papierchromatogramm konnte die Amadori-Verbindung durch ihre Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid nachgewiesen werden. Nach Abdampfen i. Vak. bei 35-4o° und Aufnehmen in Benzol liessen sich geringe Mengen Ausgangsmaterial zurückgewinnen.

3. Versuch zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-benzoyl-D-glucosylamin.

o.28 g (o.ool Mol) 6-O-Benzoyl-D-glucose (lol) und o.14 g (o.ool Mol) Anthranilsäure wurden in 5 ccm Methanol gelöst und kurz aufgekocht. Die Reaktion mit o-Dinitrobenzol fiel positiv aus. Bei 0° trat keine Kristallisation ein. Auch durch Versetzen mit Petroläther, Aether oder Chloroform konnte keine Fällung erzielt werden.

4. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-N-benzyl-D-glucosylamin.

Je o.21 g (o.ool Mol) N-Benzylanthranilsäure und o.18 g (o.ool Mol) D-Glucose wurden

a) in lo ccm Aethanol kurz aufgekocht und
b) in lo ccm Aethanol 2 Stdn. zum Sieden gebracht.

Die Lösungen blieben wasserklar. Im Papierchromatogramm waren nur die Ausgangsprodukte nachweisbar. Im Eisschrank kristallisierte quantitativ N-Benzylanthranilsäure aus.

5. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-D-fruktose.

Je o.21 g (o.oo1 Mol) N-Benzylanthranilsäure und o.18 g (o.oo1 Mol) D-Glucose wurden

a) in 5 ccm Dioxan und o.5 ccm Eisessig 5o Stdn. auf loo° erhitzt,

b) in 5 ccm Pyridin und 1 ccm Eisessig einen Tag auf loo° erwärmt,

c) in 5 ccm Dioxan und o.5 ccm Eisessig 7 Tage bei 5o-6o° stehengelassen und

d) in lo ccm mit Ammoniumchlorid gesätt. Glykolmonomethyläther 2 Stdn. auf loo° und lo Stdn. auf 8o° erhitzt.

In allen Fällen wurden die Lösungen tiefbraun, und es liess sich mit o-Dinitrobenzol die Bildung einer Amadori-Verbindung nachweisen. Bei d) waren im Papierchromatogramm deutlich drei fluoreszierende Flecken zu erkennen, von denen zwei mit Anilinphthalat positiv reagierten. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid trat jedoch bei Zimmertemperatur keine Reaktion ein. Höhere Konzentrationen konnten nicht aufgetragen werden, da N-Benzylanthranilsäure zur Schwanzbildung neigt. Nach üblichem Aufarbeiten konnte in jedem Falle N-Benzylanthranilsäure zurückgewonnen werden.

6. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose.

Je o.21 g (o.oo1 Mol) N-Benzylanthranilsäure und o.27 g (o.oo1 Mol) 4.6-Benzal-D-glucose (99) wurden

a) 13 Stdn., b) 2o Stdn., c) 66 Stdn.

in 5 ccm Dioxan und o.5 ccm Eisessig auf loo° erwärmt. Mit o-Dinitrobenzol liess sich eine steigende Bildung an Amadori-Verbindung feststellen. Gleichzeitig verstärkte sich aber auch die Huminstoffbildung, sodass die Amadori-Verbindung nach Aufarbeiten in der üblichen Weise nicht isoliert werden konnte.

7. Versuche zur Synthese von N-(o-Carbmethoxyphenyl)-D-glucosylamin.

Je o.3 g (o.oo2 Mol) Anthranilsäure-methylester und o.18 g (o.oo1 Mol) D-Glucose wurden in 1o ccm Aethanol und 2 ccm Wasser

a) 1 Stde. bei 95° und

b) 2 Stdn. bei 1oo°

erwärmt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. bei 35-4o° abgedampft. Nach Aufnehmen in einigen Tropfen Aethanol und Versetzen mit Aether fielen weisse Kristalle vom Schmp. 155-157° aus. Nach Umkristallisation aus wenig Aethanol sank der Schmp. auf 147-153°. Im Papierchromatogramm wurde viel Glucose neben wenig Anthranilsäure-Zucker-Verbindung gefunden. Nach weiterem Umkristallisieren konnte reine Glucose isoliert werden. Liess man die Reaktionslösung mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen, so färbte sie sich hellgelb und reagierte mit o-Dinitrobenzol schwach Amadori-positiv.

$C_{14}H_{19}NO_7 \cdot H_2O$	(331.3)	Ber.	C 5o.75	H 6.39	N 4.23
$C_{14}H_{19}NO_7 \cdot 1/2H_2O$	(322.3)	Ber.	C 52.17	H 6.26	N 4.34
		Gef.	C 51.44	H 6.25	
			C 51.27	H 6.44	N 4.o8

8. Versuch zur Synthese von N-(o-Carbmethoxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin.

o.3 g (o.oo2 Mol) Anthranilsäure-methylester und o.84 g (o.oo1 Mol) 6-O-Trityl-D-glucose wurden in 5 ccm Aethanol 1o Min. am Rückfluss gekocht. Die braune Lösung gab mit o-Dinitrobenzol Blaufärbung. Nach Aufarbeiten in der üblichen Weise konnten nur braune Schmieren isoliert werden.

9. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carbmethoxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose.

o.75 g (o.oo5 Mol) Anthranilsäure-methylester und 1.4 g (o.oo5 Mol) 4.6-Benzal-D-glucose wurden in 1o ccm Dioxan und 1.8 ccm Eisessig gelöst und 2 Stdn. bei 1oo° erhitzt. Alka-

lische o-Dinitrobenzollösung reagierte positiv, und es trat Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach Abdampfen i. Vak. bei 4o° und Aufnehmen in Aethanol konnte 4.6-Benzal-D-glucose zurückgewonnen werden.

10. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

a) Durch saure Hydrolyse.

Je o.39 g (o.ool Mol) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose (51) wurden

1) in 2o ccm Wasser 4 Tage auf 5o° erwärmt. Die Lösung blieb hell. Im Papierchromatogramm konnte keine 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose gefunden werden.
2) in 2o ccm mit Natriumacetat gepufferter 2n Essigsäure 1o Stdn. auf 1oo° erhitzt. Die Lösung färbte sich langsam braun. Gleichzeitig trat Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach Abdampfen i. Vak. bei 35-4o° blieb ein schwarzer Sirup zurück. Im Papierchromatogramm war 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose gut nachzuweisen.
3) in 2o ccm 2n Essigsäure 4 Tage bei 5o° stehengelassen. Ergebnisse wie unter 2).
4) in 2o ccm o.o5n Salzsäure 1o Stdn. auf 1oo° erwärmt. Die Lösung war gelb gefärbt, die Ergebnisse sonst wie unter 2).
5) in 2o ccm Aethanol gelöst, mit konz. Salzsäure auf pH 1 gebracht und kurz aufgekocht. Nach Neutralisation mit festem Natriumbicarbonat wurde i. Vak. bei 35-4o° abgedampft. Der anfallende, dunkelbraune Sirup zeigte die gleichen Eigenschaften wie unter 2) beschrieben.
6) in 2o ccm Aethanol gelöst, mit konz. Salzsäure auf pH 1 gebracht und 12 Stdn. bei 4o° stehengelassen. Die dunkelgrüne Lösung wurde wie oben neutralisiert und eingeengt. Nach Aufnehmen in Alkohol konnte mit Aether, Petroläther oder Chloroform ein weisser Niederschlag gefällt werden, der aber beim Absaugen schlagartig braun und schmierig wurde, sobald das Lö-

sungsmittel abgezogen war. Chromatographierte man diese Schmiere, so konnte viel 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose neben 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose und wenig Anthranilsäure nachgewiesen werden.

7) in 2o ccm Aethanol gelöst und mit konz. Schwefelsäure auf pH 1 gebracht. Nach 2-3-stdg. Kochen war die Lösung tief violett, nach 1o-stdg. Stehenlassen bei 5o° dunkelgrün gefärbt. Es wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert. Nach Aufarbeiten in der üblichen Weise ergaben sich die gleichen Ergebnisse wie unter 6). Durch Lyophilisieren erhielt man glasige Rückstände, die nach Aufnehmen in Alkohol blaue Lösungen ergaben und mit Aktiv-Kohle nicht zu entfärben waren. Durch Säulenchromatographie an Cellulose konnten an 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose angereicherte Fraktionen erhalten werden. (Eluierung mit Isopropanol). Eine weitere Reinigung gelang jedoch nicht.

b) Durch Hydrogenolyse.

Je 1oo mg 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose wurden in einer Mikrohydrierapparatur

1) in 5 ccm Methanol mit 5o mg vorhydriertem $Pd/BaSO_4$ (5% Pd),
2) in 2.5 ccm Methanol und 2.5 ccm Essigester mit 5o mg vorhydriertem Pd-Schwarz,
3) in 5 ccm Dioxan mit 5o mg vorhydriertem $Pd/BaSO_4$ (1o% Pd),
4) in 5 ccm Dioxan mit 5o mg vorhydriertem Pd-Schwarz,
5) in 5 ccm Dioxan mit 5o mg vorhydrierter Pd/Tierkohle

bei Zimmertemperatur und bei 5o° hydriert. Im ersten Fall konnte keine Wasserstoff-Aufnahme beobachtet werden, während bei erhöhter Temperatur eine minimale Hydrierung eintrat, wie mit Hilfe von Papierchromatogrammen nachgewiesen werden konnte.

In einer normalen Hydrierapparatur wurden o.5 g Palladiumchlorid in Methanol vorhydriert und der Katalysator sehr sorgfältig mit destilliertem Methanol gewaschen. Nach Zugabe

einer Lösung von o.5 g 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose in 5o ccm Methanol liess sich aber weder bei Zimmertemperatur noch bei 5o° eine Wasserstoff-Aufnahme feststellen. Erst nach Ansäuern mit 1o ccm o.1n Salzsäure konnte die Hydrierung in Gang gesetzt werden. Nach 1 Stde. war die theoretische Menge (=58 ccm) Wasserstoff verbraucht. Es wurde sofort mit o.1n Natronlauge neutralisiert. Nach Entfernung des Methanols bei 3o° i. Vak. fiel wenig 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose aus. Nach Filtration wurde die wässr. Lösung bei 35-4o° i. Vak. eingedampft. Es hinterblieb ein wasserklarer Sirup, der auch nach 4 Tagen noch papierchromatographisch einheitlich aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose bestand. Er ist in Wasser sehr leicht löslich und kann aus methanolischer Lösung mit Aethanol ausgefällt werden. Durch Fällen mit Aether erhält man ein weisses, amorphes Pulver, das auch durch mehrmaliges, fraktioniertes Umfällen nicht in analysenreiner Form erhalten werden konnte.

Verwendete man Pd-Tierkohle als Katalysator, so wurde weder in Methanol noch in Methanol/o.1n Salzsäure unter den gleichen Bedingungen, wie vorher beschrieben, hydriert.

c) Durch präparative Dünnschichtchromatographie.

o.5 g 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose werden in 1oo ccm Methanol und 2 ccm 4.4n Schwefelsäure, wie unter b) beschrieben, hydriert. Nach Neutralisation mit Bariumhydroxyd und Filtration engt man die Lösung i. Vak. auf 3 ccm ein. Die ausgefallene 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose wird abfiltriert und die klare Lösung auf 2o Kieselgur-G-Platten (2ox2o) streifenförmig aufgetragen. Nach Entwicklung mit Benzol/Methanol 6:1 lassen sich die Streifen bei R_F o.98 leicht mit einer Rasierklinge herausheben und die Amadori-Verbindung zuerst mit 2oo ccm Isopropanol und dann zweimal mit je 1oo ccm Methanol eluieren. Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel i. Vak. bei 3o° können 2o mg (=5% d.Th.) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose mit Aether als weisses,

amorphes Pulver in analysenreiner Form gefällt werden. Bei der Filtration ist darauf zu achten, dass der Niederschlag stets feucht bleibt, da er sonst verläuft und leicht braun wird. $\alpha_D^{24.5}$: + 43.3° (keine Mutarotation, c = o.9, in Methanol). Schmp. loo-lo2° (Zers.).

$C_{13}H_{17}NO_7$	(299.27)	Ber.	C 52.17	H 5.73	N 4.68
$C_{13}H_{17}NO_7 \cdot 1/2H_2O$	(3o8.3)	Ber.	C 5o.69	H 5.89	N 4.55
		Gef.	C 5o.99	H 6.47	N 4.25

Einw. 3.971 mg CO_2 7.37 mg H_2O 2.28 mg
Einw. 3.631 mg o.135 ccm N_2 27/763

11. Versuche zur Herstellung des Brucinsalzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

o.2 g Sirup von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose wurden in 7 ccm Methanol gelöst, mit lo ccm einer o.1m methanolischen Brucinlösung versetzt und vorsichtig Isopropanol zugegeben, bis eine leichte Trübung bestehen blieb. Beim vorsichtigen Eindampfen i. Vak. bei 2o° fiel ein weisser Niederschlag aus, der abfiltriert und gut mit Isopropanol gewaschen wurde. Auch nach weiterem Umfällen mit Isopropanol aus Methanol konnte das Salz nicht in analysenreiner Form isoliert werden.

12. S-Benzylisothiuroniumsalz von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose.

o.5 g (o.ool3 Mol) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose werden mit 25 ccm Aethanol als Lösungsvermittler versetzt und mit o.ln Natronlauge (13 ccm) gegen Phenolphthalein neutralisiert. Mit 2 Tropfen o.ln Salzsäure wird schwach angesäuert, die Lösung i. Vak. bei 3o° auf 2o ccm eingeengt und dann mit o.22 g (o.ool3 Mol) S-Benzylisothiuroniumchlorid versetzt. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisiert das Salz in langen, feinen Nadeln aus. Versucht man, aus Aethanol/Wasser umzukristallisieren, so tritt Zerfall ein.

Schmp. 128-129° (Zers.). Ausbeute: o.4 g = 57% d.Th.

$C_{28}H_{31}N_3O_7S$ (541.54)

Ber. C 59.88 H 5.77 N 7.76 S 5.91
Gef. C 58.95 H 5.78 N 7.81 S 5.43

Einw. 4.8o3 mg CO_2 1o.375 mg H_2O 2.48o mg
Einw. 3.o25 mg o.218 ccm N_2 26/721
Einw. 1o.139 mg 4.o1o mg $BaSO_4$
Gef. C 59.o3 H 5.86
Einw. 4.945 mg CO_2 1o.695 mg H_2O 2.59o mg
Gef. C 58.99 H 5.87
Einw. 4.27o mg CO_2 9.23o mg H_2O 2.24o mg

13. Versuch zur Herstellung des S-Benzylisothiuroniumsalzes von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose.

1.5 g 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose wurden, wie unter 1ob) beschrieben, in Methanol/Salzsäure hydriert, die auf 2o ccm eingeengte und filtrierte Lösung mit 1n Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert, mit o.1n Salzsäure wieder schwach angesäuert, i. Vak. auf 1o ccm eingeengt und mit einer Lösung von o.6 g S-Benzylisothiuroniumchlorid in 4 ccm Wasser versetzt. Beim Abkühlen auf 0° fiel ein farbloses Oel aus, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

14. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-trityl-D-ribosylamin.

Je o.39 g (o.oo1 Mol) 5-O-Trityl-D-ribose (1o) und o.14 g (o.oo1 Mol) Anthranilsäure wurden

a) in 5 ccm Methanol 1o Min. zum Sieden erhitzt,
b) in 1o ccm Methanol 2 Stdn. am Rückfluss gekocht,
c) in 1o ccm Aethanol gelöst und 1o Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen,
d) in 1o ccm Aethanol gelöst und 3 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen,
e) in 5 ccm Aethanol kurz zum Sieden gebracht,

f) in 2o ccm Benzol kurz aufgekocht und

g) in 2o ccm Benzol 15 Min. am Rückfluss gekocht.

Die Lösungsmittel wurden i. Vak. bei 3o-4o° abgedampft. c) und d) ergaben hellgelbe Sirupe, die in wenig Alkohol aufgenommen wurden. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisierte 5-o-Trityl-D-ribose aus. In allen anderen Fällen zeigten die Lösungen schon während des Erhitzens eine Braunfärbung und gaben mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung eine positive Reaktion auf Amadori-Verbindungen. Die nach dem Abdampfen zurückbleibenden braunen bis schwarzen Schmieren waren nicht zur Kristallisation zu bringen.

15. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-trityl-D-ribulose.

a) o.39 g (o.oo1 Mol) 5-O-Trityl-D-ribose und o.14 g (o.oo1 Mol) Anthranilsäure wurden in 1o ccm Glykolmonomethyläther gelöst und 1 Stde. auf 1oo° erhitzt. Die Lösung färbte sich tiefbraun und gab mit o-Dinitrobenzollösung eine intensive Blaufärbung. Nach dem Abdampfen i. Vak. bei 4o° hinterblieb ein fast schwarzer Sirup, der nach einigen Tagen völlig verharzte.

b) o.13 g (o.ooo5 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-D-ribosylamin (46), o.14 g (o.ooo5 Mol) Tritylchlorid und eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfit wurden in 5 ccm Pyridin gelöst und einen Tag bei 37° stehengelassen. Die Lösung färbte sich hellbraun. Nach Zugabe von Wasser fiel Triphenylcarbinol aus. Das Filtrat reduzierte alkalische o-Dinitrobenzollösung. Nach Abdampfen des Pyridins i. Vak. bei 4o° blieb ein schwarzer Teer zurück, der nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

16. Versuch zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-trityl-D-arabinosylamin.

o.39 g (o.oo1 Mol) 5-O-Trityl-D-arabinose (11) und o.14 g (o.oo1 Mol) Anthranilsäure wurden in 5 ccm Aethanol gelöst und 1o Min. zum Sieden gebracht. Dabei färbte sich die Lö-

sung hellbraun. Alkalische o-Dinitrobenzollösung wurde blau. Nach Abdampfen i. Vak. bei 35° und Aufnehmen in wenig Alkohol liess sich nur Tritylarabinose zurückgewinnen.

17. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-trityl-D-ribulose aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin.

Je o.27 g (o.oo1 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin (51) und o.28 g (o.oo1 Mol) Triphenylchlormethan wurden in 5 ccm absol. Pyridin gelöst und

a) 15 Stdn. bei 37°,

b) 15 Stdn. bei 4o-45°

stehengelassen. Die Lösungen färbten sich tiefbraun und zeigten starke Reduktionswirkung gegenüber o-Dinitrobenzol. Nach Abdampfen des Pyridins i. Vak. bei 4o° konnten ungefähr 3o% bzw. 2o% des eingesetzten Glykosylamins zurückgewonnen werden. Die Mutterlaugen waren nicht zur Kristallisation zu bringen.

18. Versuche zur Synthese von N-(o-Carboxyphenyl)-5-O-benzyl-D-ribosylamin und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-5-O-benzyl-D-ribulose.

Je o.14 g (o.oo1 Mol) Anthranilsäure wurden

a) mit o.22 g (o.oo1 Mol) 5-O-Benzyl-D-ribose (39) in 2 ccm Aethanol kurz aufgekocht und

b) mit o.44 g (o.oo2 Mol) 5-O-Benzyl-D-ribose in 5 ccm Aethanol gelöst und mehrere Tage bei 4° stehengelassen.

Bei a) trat mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung starke, bei b) schwache Blaufärbung ein. In keinem Fall konnte der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. bei 3o-4o° erhaltene Sirup zur Kristallisation gebracht werden. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung (Benzol/Methanol 7:1) ergab folgende Werte: R_F Anthranilsäure ^{1}, R_F D-Arabinose und D-Ribose $^{o.2}$, R_F Benzylribose $^{o.95}$ und einen sehr schwachen Fleck bei o.7, der fluoreszierte und mit Anilinphthalat eine positive Zuckerreaktion gab.

19. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-N-benzyl-1-desoxy-D-ribulose.

o.3 g (o.oo2 Mol) D-Arabinose und o.41 g (o.oo2 Mol) N-Benzylanthranilsäure wurden in 5 ccm Methanol 1o Min. im Wasserbad am Rückfluss gekocht und dann 2 Wochen auf 4o-8o° erhitzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich braun, und mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung konnte eine Amadori-Verbindung nachgewiesen werden. Im Papierchromatogramm waren allerdings nur die Ausgangsprodukte wiederzufinden. Nach üblichem Aufarbeiten konnte N-Benzylanthranilsäure fast quantitativ zurückgewonnen werden.

20. Versuche zur Synthese von 4.5-Monoaceton-D-arabinose.

a) 5 g (o.o16 Mol) 4.5-Isopropyliden-D-arabinose-diäthylmercaptal (1o2) wurden in 5o ccm Aceton und wenig Wasser gelöst, mit 6 g $HgCl_2$ und 6 g gelbem HgO versetzt und über Nacht gerührt, die Quecksilbersalze abfiltriert und das Filtrat in Gegenwart von gelbem HgO i. Vak. bei 3o° eingedampft. Im Eisschrank kristallisieren aus Aethanol zunächst $HgCl_2$ und dann Arabinose aus.

b) 3.1 g (o.o1 Mol) 4.5-Isopropyliden-D-arabinose-diäthylmercaptal wurden in 1oo ccm Aceton gelöst, mit 3 g $HgCl_2$ und 3 g gelbem HgO versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Filtration und Abdampfen des Acetons i. Vak. bei 3o° wurde der Sirup in 5o ccm Wasser aufgenommen, mit Lewatit MIH 3o Min. gerührt und die wässr. Lösung bei 35° i. Vak. zur Trockene eingedampft. Aus Aethanol erhielt man o.9 g (= 6o% d.Th.) D-Arabinose.

21. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose.

o.5 g N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin werden in 3 ccm Glykolmonomethyläther 4 Stdn. bei 1oo° und dann 5 Stdn. bei 6o° erwärmt. Nach Filtration engt man die tiefbraune Lösung i. Vak. auf 1 ccm ein, verdünnt mit 2 ccm Methanol und trägt dieses Gemisch streifenförmig auf 2o Kieselgur-G-Platten

(2ox2o) auf. Nach Entwicklung mit Benzol/Methanol 12:1 kann die Amadori-Verbindung bei R_F o.9 mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Reagenz nachgewiesen werden. (R_F Anthranilsäure 1.o, R_F Arabinosylamin o.5). Die Streifen von etwa o.8 bis o.91 werden mit einer Rasierklinge vorsichtig herausgehoben und die Amadori-Verbindung einmal mit 2oo ccm Isopropanol und zweimal mit je loo ccm Methanol extrahiert. Nach Abdampfen der Lösungsmittel i. Vak. bei 3o° lassen sich mit Aether etwa 15 mg (= 3% d.Th.) 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose als weisses, amorphes Pulver fällen. Der Niederschlag muss nach dem Filtrieren noch feucht in den Exsikkator gebracht werden, da er an der Luft sofort braun wird. Im Exsikkator tritt erst nach wenigen Tagen Braunfärbung ein. Schmp. 85-9o° (Zers.).

$C_{12}H_{15}NO_6$ (269.35)

Ber. C 53.53 H 5.62 N 5.2o

Gef. C 52.79 H 6.38 N 5.57

Einw. 2.5o8 mg CO_2 4.85 mg H_2O 1.43 mg

Einw. 2.77o mg o.138 ccm N_2 29/725

22. Austestung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose an Tryptophan-Mangelmutanten und an tryptophanabhängigen Mikroorganismen.

Für die Untersuchungen wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt:

Tabelle 1

Anzahl	Gattung	Herkunft	genaue Bezeichnung
1	Saccharomyces cerevisiae	H.C.Douglas (65)	lool-5c
1	S.cerevisiae	R.K.Mortimer (62)	DX 12
3	Salmonella typhimurium	Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbour, N.Y., USA.	try-2,8,14
1	Lactobacillus arabinosus	National Collection of Type Cultures, London.	17-5
1	Streptococcus faecalis	American Type Culture Collection.	979o

Für die verschiedenen Stämme verwendete man folgende Testmedien, die nach Zusatz von 10γ L-Tryptophan/ml Nährlösung Wachstum, ohne Tryptophanzusatz jedoch kein Wachstum ermöglichen:

Tabelle 2

Gattung	Vollmedium	Testmedium	Kulturbedingungen
Saccharomyces cerevisiae	1-proz. Difco Yeast Extrakt, 1-proz. Pepton Difco, 2-proz. Glucose.	Minimalmedium (52)	30°
Salmonella typhimurium	Bacto Nutrient Broth, Difco.	Minimalmedium (38)	37°
Lactobacillus arabinosus	Tryptophan Assay Medium, Difco und 10γ L-Tryptophan/ml.	Tryptophan Assay Medium, Difco.	37°

Zur Durchführung der Wachstumsversuche wurden die Mikroorganismen im entsprechenden Vollmedium (Tab.2) vorgezüchtet, abzentrifugiert und in Saline aufgeschwemmt. 5 ccm Testmedium (Tab.2) wurden dann mit jeweils 51.4γ Anthranilsäure, 112.3γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose oder 101.0γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose komplettiert, mit etwa 10^4 Zellen/ml aus den vorbereiteten Kulturen angeimpft und 24 Stdn. bebrütet. Die Ergebnisse der Trübungsmessungen sind in Tab.3 wiedergegeben. Aus ihr geht hervor, dass bei der Mangelmutanten try-8 von S.typhimurium und bei L.arabinosus alle drei Verbindungen wachstumswirksam waren, während alle anderen Versuche negativ ausfielen.

Tabelle 3

tryptophanabhängiger Organismus	Wachstum mit Anthranilsäure	Fruktose-Amadori-Verb.	Ribulose-Amadori-Verb.
Saccharomyces cerevisiae 1001-5c	-	-	-
DX 12	-	-	-
Salmonella typhimurium try-2	-	-	-
try-8	+	+	+
try-14	-	-	-
Lactobacillus arabinosus 17-5	+	+	+
Streptococcus faecalis 9790	-	-	-

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Abhängigkeit des Wachstums von der Menge der zugegebenen Anthranilsäure, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose bzw. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose und von der Zeit an Lactobacillus arabinosus ausgetestet. Jeweils 5 ccm Minimalmedium (Tab.2) wurden mit steigenden Mengen gleicher molarer, wässr. Lösungen von 3o.9γ Anthranilsäure/ml, 67.4γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose/ml bzw. 6o.6γ 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose/ml versetzt und mit etwa 10^4 Zellen/ml angeimpft, die aus einer Kultur stammten, die im entsprechenden Vollmedium (Tab.2) vorgezüchtet, abzentrifugiert und in Saline aufgeschwemmt war. Es wurde bei 37° bebrütet und die Zunahme der Trübung in Abständen von mehreren Stunden gemessen.

Tabelle 4

Anthran. säure ml	9 Std.	11 Std.	21.5 Std.	24 Std.	28 Std.	Fruktose Amadori. ml	9 Std.	11 Std.	21.5 Std.	24 Std.	28 Std.
o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
o.1	2	3	23	23	29 31	o.1	o	o	1	1	o 1
o.2	2	3	38	41	44 46	o.2	o	o	2	3	4 6
o.4	6	9	54	56	59 62	o.4	4	5	14	14	15 16
o.8	2	3	61	65	72 8o	o.8	2	5	2o	22	25 25
1.o	2	5	59	62	73 8o	1.o	3	6	24	26	28 29
1.3	9	11	63	67	73 79	1.3	13	17	34	34	4o 41
1.6	12	14	64	66	74 79	1.6	16	21	41	42	47 48
2.o	13	15	6o	63	71 76	2.o	13	17	47	46	5o 52
2.2	22	25	66	68	73 77	2.2	23	26	57	59	62 63
2.6	28	3o	68	7o	75 78	2.6	24	27	58	6o	64 66
3.o	33	36	66	67	71 75	3.o	33	36	64	66	68 71

Anthran. säure ml	12.5 Stdn.	14 Stdn.	18 Stdn.	21 Stdn.	Ribulose Amadori. ml	12.5 Stdn.	14 Stdn.	18 Stdn.	21 Stdn.
o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
o.1	58	6o	63	65	o.1	52	56	55	56
o.2	65	78	83	87	o.2	56	59	64	68
o.4	8o	84	9o	98	o.4	62	65	71	73
o.8	84	87	98	1oo	o.8	67	71	78	81
1.o	8o	82	92	94	1.o	74	77	83	87
1.3	83	85	95	96	1.3	8o	81	87	89
1.6	85	86	93	95	1.6	78	81	87	91
2.o	83	85	93	95	2.o	75	78	84	87
2.2	79	82	91	95	2.2	79	81	86	88
2.6	8o	82	91	92	2.6	8o	84	92	9o
3.o	81	82	87	89	3.o	86	9o	92	9o

Die aus den Wachstumsversuchen mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose an Lactobacillus arabinosus stammenden Kulturen wurden abzentrifugiert, die Lösungen i. Vak. bei 30-35° eingedampft und die Rückstände in wenig Aethanol aufgenommen. Das gleiche Vollmedium (Tab.2) versetzte man zur Kontrolle jeweils mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose, 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose oder Anthranilsäure, erwärmte 24 Stdn. auf 37°, ohne jedoch vorher anzuimpfen, und arbeitete die Lösungen in analoger Weise auf. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung erfolgte im Fliessmittelsystem Benzol/Methanol/Eisessig 8:1:1. Beim Besprühen mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Reagenz bildetem die Amadori-Verbindungen bereits bei Zimmertemperatur einen roten Fleck. Die Ergebnisse sind in Tab.5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Lösung	R_F	Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlo.
Fruktose-Amadori-Verbindung aus Wachstumsversuchen	o.77	+
Fruktose-Amadori-Verbindung + Medium, 24 Stdn. bei 37°	o.76	+
Fruktose-Amadori-Verbindung	o.75	+
Ribulose-Amadori-Verbindung aus Wachstumsversuchen	o.91	+
Ribulose-Amadori-Verbindung + Medium, 24 Stdn. bei 37°	o.91	+
Ribulose-Amadori-Verbindung	o.92	+
Anthranilsäure + Medium, 24 Stdn. bei 37°	o.75	+
Anthranilsäure	1.o	-

23. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat aus 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose und Dibenzylphosphorylchlorid.

Zu einer gekühlten Lösung von 7.1 g (o.o2 Mol) 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose (69) in 2o ccm absol. Pyridin wurden 4o ccm einer Lösung von 6.o g (o.o23 Mol) Dibenzylphos-

phorylchlorid in Chloroform langsam bei 0° zugetropft. Nach zweitägigem Stehenlassen im Eisschrank rührte man das Gemisch vorsichtig in 600 ccm Eiswasser ein, dekantierte vom ausgefallenen Sirup ab, nahm den Rückstand in Chloroform auf, wusch die Chloroform-Lösung einmal mit verd. Salzsäure und zweimal mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte dann i. Vak. bei 35-40° ein. Der resultierende, gelbe Sirup konnte mit Aktivkohle weitgehend entfärbt werden, liess sich aber nicht zur Kristallisation bringen. Im Dünnschichtchromatogramm (Butanol/3% Ammoniak 1:1) traten 2 Flecken bei R_F 0.7 und bei R_F 1.0 auf, von denen der Fleck bei R_F 1.0 mit 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose identisch war. Der andere reagierte mit Ammoniummolybdat unter Blaufärbung und zeigte im UV-Licht eine schwache Fluoreszenz, sodass es sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um das gesuchte 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-dibenzylphosphat handelte. Eine Trennung der beiden Substanzen gelang nicht.

Ein Versuch, dieses Gemisch mit Natrium in Methanol bei 0° zu entacetylieren, führte zu einem Gemisch aus Glucose, Glucose-6-phosphat und anorganischen Salzen, das nicht weiter untersucht wurde.

24. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat aus 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat.

A. Zur Entacetylierung wurden

a) 7 g 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat (44) in 200 ccm absol. Methanol gelöst, etwa 30 mg Natrium zugegeben und 2 Tage im Eisschrank stehengelassen,

b) 0.8 g 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat in 200 ccm absol. Methanol gelöst, auf 0° gekühlt und mit 20 mg Natrium über Nacht bei 0° reagieren gelassen,

anschliessend mit CO_2 neutralisiert und die Lösungsmittel i. Vak. bei 30-40° abgedampft. In beiden Fällen trat Geruch nach Phenol auf. Der Sirup konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden.

B. Je o.5 g 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat wurden

a) in 35 ccm Aceton gelöst, mit 3.5 ccm n Natronlauge und 15 ccm Wasser versetzt und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen.

b) in 5 ccm Aceton und 5 ccm Wasser gelöst und bei 4° viermal im Abstand von je einer Stde. o.9 ccm 1n Natronlauge zugegeben.

Nach Neutralisation mit 1n Salzsäure und üblichem Aufarbeiten roch der Sirup stark nach Phenol. Im Dünnschichtchromatogramm (Petroläther/Benzol 6:2) trat bei R_F o ein mit Anilinphthalat und Ammoniummolybdat stark reagierender Fleck, bei R_F 1 ein nur sehr schwach mit Anilinphthalat reagierender Fleck auf. (R_F Glucose-6-phosphat ^{0}, R_F Tetraacetylglucose-6-diphenylphosphat$^{1.0}$).

C. Je o.58 g (o.oo1 Mol) 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat wurden in 1o ccm Aceton und 1o ccm Wasser gelöst und mit dem pH-Meter bei einem pH-Maximum von 1o.5

a) mit 6o ccm und

b) mit 4o ccm

o.1n Natronlauge titriert. In gleichen Zeiträumen wurden während des gesamten Titrationsverlaufes gleiche Mengen Natronlauge verbraucht. Die Lösungen färbten sich gelbbraun. Nach üblichem Aufarbeiten trat in beiden Fällen Geruch nach Phenol auf. Bei a) konnte nur noch Glucose-6-phosphat nachgewiesen werden, während bei b) Glucose-6-phosphat und Ausgangsmaterial nebeneinander vorlagen.

D. Je o.5 g 1.2.3.4-Tetra-O-acetyl-D-glucose-6-diphenylphosphat wurden

a) in 2o ccm Aceton gelöst und 3o Min. NH_3,

b) in 2o ccm Aceton gelöst und 6 Stdn. NH_3,

c) in 2o ccm Dioxan gelöst und 1 Stde. NH_3,

d) in 2o ccm Dioxan gelöst und 7 Stdn. NH_3

durchgeleitet. Bei a) und b) konnte im Dünnschichtchromatogramm (Petroläther/Benzol 6:2) nur ein Fleck bei R_F 1 festgestellt werden, der mit Ammoniummolybdat und im Gegensatz zum Ausgangsmaterial mit Anilinphthalat stark positiv rea-

gierte. Die Lösungen waren rotbraun gefärbt, und nach Abdampfen des Lösungsmittels hinterblieben etwa 4 g eines zähen, braunen Sirups. Bei c) konnten nach Abdampfen des Dioxans 9o% Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden, während bei d) der nach dem Abdampfen zurückbleibende, braune Sirup stark nach Phenol roch und vorwiegend aus Glucose-6-phosphat bestand.

25. Versuch zur Synthese von 1.2.3-Tri-O-acetyl-D-ribose.

2.6 g (o.oo5 Mol) 1.2.3-Tri-O-acetyl-5-O-trityl-D-ribose (1o) wurden in 1o ccm Eisessig gelöst, bei 0° mit 1.5 ccm HBr/Eisessig kurz durchgeschüttelt, sofort abfiltriert und das Filtrat so rasch wie möglich in 2o ccm Eiswasser eingerührt. Das gesamte Gemisch wurde dann zweimal mit je 5o ccm Chloroform extrahiert, der Extrakt einmal mit gesätt. Natriumbicarbonatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. bei 3o-35° eingedampft. Nach Aufnehmen des Sirups in Aethanol kristallisierten o.6 g (= 65% d.Th.) weisser Kristalle aus, die mit 2.3-Di-O-acetyl-anhydroribose (1.5)(1.4) (1o) identisch waren.

26. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-dibenzylphosphat aus D-Glucose und Dibenzylphosphorsäure.

Je o.36 g (o.oo2 Mol) D-Glucose wurden in 1o ccm absol. Pyridin gelöst, auf -5° gekühlt und

a) mit o.39 g (o.oo2 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetztund eine Lösung von o.28 g (o.oo1 Mol) Dibenzylphosphorsäure in 15 ccm absol. Pyridin innerhalb von 3 Stdn. unter Rühren zugetropft,

b) mit o.39 g (o.oo2 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und eine Lösung von o.56 g (o.oo2 Mol) Dibenzylphosphorsäure in 2o ccm absol. Pyridin innerhalb von 4 Stdn. zugetropft.

Die Lösungen wurden noch weitere 5 Stdn. bei -5° gerührt und dann über Nacht im Eisschrank stehengelassen. Nach Abdampfen des Pyridins liess sich die Glucose mit Aethanol fast quanti-

tativ wieder ausfällen. Im Dünnschichtchromatogramm (Benzol/Methanol 6:1) trat in beiden Fällen ein sehr schwacher Fleck bei R_F o.95 auf, der mit Anilinphthalat und Ammoniummolybdat positiv reagierte.

27. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-dibenzylphosphat.

o.6 g (o.oo2 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin wurden in 8 ccm absol. Pyridin gelöst, auf -4° gekühlt, o.78 g (o.oo4 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und im Verlauf von 5 Stdn. eine Lösung von 1.12 g (o.oo4 Mol) Dibenzylphosphorsäure in 2o ccm absol. Pyridin unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch blieb über Nacht im Eisschrank stehen. Nach Abdampfen des Pyridins i. Vak. bei 3o-35° konnten 85% des Ausgangsamins zurückgewonnen werden. Im Dünnschichtchromatogramm (Benzol/Methanol 7:1) trat ein schwacher Fleck bei R_F o.95 auf, der mit Anilinphthalat und Ammoniummolybdat positiv reagierte (R_F Glucosylamin o.65).

28. Versuche zur Synthese von D-Glucose-6-diphenylphosphat aus D-Glucose und Diphenylphosphorsäure.

Je 1.8 g (o.o1 Mol) D-Glucose wurden in 2o ccm absol. Pyridin gelöst,

a) auf -6° und
b) auf 0° gekühlt, o.6 g (o.oo3 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und eine Lösung von o.5 g (o.oo25 Mol) Diphenylphosphorsäure in 2o ccm absol. Pyridin im Verlauf von 6 Stdn. zugetropft.
c) auf 0° gekühlt, 1.1 g (o.oo56 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und eine Lösung von 1.o g (o.oo5 Mol) Diphenylphosphorsäure in 1o ccm absol. Pyridin langsam zugetropft.

Die Reaktionslösungen waren hellbraun gefärbt. Nach Abdampfen des Pyridins i. Vak. bei 35° und Zugabe von Aethanol konnte die eingesetzte Glucose zu 95% zurückgewonnen werden. Es blieb ein Sirup zurück, der zum grössten Teil Diphenyl-

phosphorsäure, wenig Glucose und sehr wenig einer Zucker-phosphat-Verbindung enthielt, die im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform/Methanol 7:1) den R_F-Wert o.98 hatte, wie durch die Reaktion mit Anilinphthalat und Ammoniummolybdat nachgewiesen wurde.

29. Versuch zur Synthese von D-Arabinose-5-diphenylphosphat.

4.5 g (o.o3 Mol) D-Arabinose wurden in 35 ccm absol. Pyridin gelöst, auf -5° gekühlt, 2.1 g (o.oll Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und eine Lösung von 2.5 g (o.ol Mol) Diphenylphosphorsäure in lo ccm absol. Pyridin im Verlauf von 2 Stdn. unter Rühren zugetropft. Nach zweitägiger Reaktion im Eisschrank erfolgte die Aufarbeitung wie oben beschrieben. Die Arabinose wurde zu 9o% zurückgewonnen. Im Dünnschichtchromatogramm konnten bei R_F o.95 Spuren eines bisher nicht identifizierten Zuckerphosphates nachgewiesen werden.

30. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin und Phosphoroxychlorid.

In vier verschiedenen Versuchen wurden 1.5 g (o.o5 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-D-glucosylamin in 25 ccm absol. Pyridin gelöst, auf -5° bis 0° gekühlt und unter Rühren eine Lösung von o.8 g (o.o52 Mol) Phosphoroxychlorid in 25 ccm absol. Pyridin bzw. absol. Dioxan innerhalb von 2-5 Stdn. zugetropft, weitere 2 Stdn. bei 0° gerührt, über Nacht im Eisschrank stehengelassen und dann mit einigen Tropfen Wasser vorsichtig hydrolisiert. Die Reaktionslösungen wurden dünnschichtchromatographisch in den Systemen Isopropanol/Wasser 85:15, Benzol/Methanol 7:1 und papierchromatographisch im System Butanol/3% Ammoniak 1:1 untersucht. Dabei ergab sich, dass das eingesetzte Glykosylamin zum grössten Teil unverändert geblieben war, sich zu einem geringen Teil aber zur 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose umgelagert hatte. Ausserdem wurden zwei neue Verbindungen gebildet, die auf

dem Papierchromatogramm bei R_F o.66 und R_F o.92 zwei fluoreszierende Flecken bildeten, die aber mit Anilinphthalat und Ammoniummolybdat nicht reagierten. (R_F Anthranilsäure o.23, R_F Glucosylamin o.11, R_F Fruktose-Amadori-Verbindung o.o6).

31. Versuch zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat aus N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin und Phosphoroxychlorid.

1.o8 g (o.oo4 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin wurden in 3o ccm absol. Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt und mit einer Lösung von o.61 g (o.oo4 Mol) Phosphoroxychlorid wie unter 3o) beschrieben umgesetzt. Auch hier wurde nur wenig Arabinosylamin zur 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose umgelagert, und es bildeten sich ebenfalls geringe Mengen von zwei neuen Verbindungen mit den R_F-Werten o.65 und o.93, während der grösste Teil des Ausgangsamins nicht umgesetzt wurde. (R_F Arabinosylamin o.o9, R_F Ribulose-Amadori-Verbindung o.o4).

32. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat.

a) Durch Säulenchromatographie.

o.35 g (o.ool Mol) D-Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz und o.137 g (o.ool Mol) Anthranilsäure wurden in 5 ccm Dioxan, 2 ccm Wasser und 1 ccm Eisessig erst 3 Stdn. auf loo° und dann über Nacht auf 8o° erhitzt. Die dunkelbraune Lösung färbte alkalische o-Dinitrobenzollösung stark blau. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. bei 3o-35° abgedampft, der Sirup in 3 ccm Wasser aufgenommen und mit Isopropanol bis zur eben beginnenden Trübung versetzt. Die auf diese Weise erhaltene Lösung wurde auf zwei 3 cm weite Säulen, die 7 cm hoch mit Kieselgur gefüllt waren, verteilt. Zunächst eluierte man mit 3oo ccm Isopropanol/Säule die Huminstoffe und Anthranilsäure, dann nahm man mit Isopropanol/Wasser 95:5 25 ccm Fraktionen ab, die dünnschichtchromatographisch untersucht wurden. Der

Hauptanteil der Amadori-Verbindung wurde in den Fraktionen 3 bis 6 verunreinigt mit Anthranilsäure und Huminstoffen wiedergefunden. Mit Isopropanol/Wasser 9:1 konnte nur noch wenig 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat eluiert werden.

b) Durch präparative Dünnschichtchromatographie.

o.35 g D-Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz und o.137 g Anthranilsäure wurden wie unter a) beschrieben umgelagert, die Lösungsmittel i. Vak. bei 3o-35° abgedampft und der Sirup in 3 ccm Wasser aufgenommen. Nach dem Abfiltrieren der ungelösten Bestandteile trug man diese Lösung auf 3o Kieselgur-G-Platten (2ox2o) auf und entwickelte mit Isopropanol/Wasser 85:15. In diesem System hat die Anthranilsäure den R_F-Wert 1.o und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat den R_F-Wert o.8. Die Amadori-Verbindung wurde dreimal mit je 15o ccm Isopropanol/Wasser 85:15 eluiert. Die chromatographische Untersuchung des ersten Eluates ergab nur einen einheitlichen Fleck bei R_F o.8, der beim Besprühen mit Triphenyltetrazoliumchlorid-Reagenz sofort rot wurde. Schon beim Eindampfen der Lösungsmittel i. Vak. bei 3o° trat Braunfärbung ein. Nach 3o Stdn. waren im Dünnschichtchromatogramm die Flecken von Anthranilsäure und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat etwa gleich stark.

33. Reindarstellung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat durch präparative Dünnschichtchromatographie.

o.365 g (o.ool Mol) D-Ribose-5-phosphat, Bariumsalz wurden mit o.15 g Natriumsulfat in Wasser aufgeschlämmt, einen Tag gerührt und dann abzentrifugiert. Die wässr. Lösung des Natriumsalzes wurde eingedampft, der zurückbleibende Sirup mit o.13 g (o.ool Mol) Anthranilsäure, 5 ccm Pyridin, 1 ccm Wasser und o.5 ccm Eisessig versetzt und 2 Stdn. auf 11o° erhitzt. Die braune Lösung zeigte eine stark positive Reaktion auf Amadori-Verbindungen. Nach Abdampfen der Lösungsmittel

wurde der Rückstand in 4 ccm Wasser aufgenommen, auf 5o Kieselgur-G-Platten (2ox2o) verteilt und mit Isopropanol/Benzol/Wasser 6:3:1 entwickelt. In diesem System lagen die R_F-Werte der Anthranilsäure bei 1.o und des 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphates bei o.85. Die Amadori-Verbindung wurde viermal mit je 15o ccm des Entwicklersystems ausgewaschen. Auch hier trat bereits beim Einengen der Lösung Braunfärbung ein. Ein Teil der etwa auf die Hälfte eingedampften Lösung wurde mit o.1n Natronlauge neutralisiert. Nach 15 Stdn. war in beiden Teilen die Amadori-Verbindung weitgehend zerfallen.

34. N-(o-Carboxyphenyl)-4.6-äthyliden-D-glucosylamin.

1.o g (o.oo6 Mol) 4.6-Aethyliden-D-glucose (33) und o.7 g (o.oo5 Mol) Anthranilsäure wurden in 5 ccm Aethanol zum Sieden erhitzt. Dabei trat nach kurzer Zeit Kristallisation ein. Es wurde aus Aethanol umkristallisiert. 1.5 g (= 91% d.Th.) (Ausbeute). α_D^{22}: -88.7° (1o Min.) --→ -48.8° (3 Tage, c=1, in Pyridin). Schmp. 174-175° (Zers.).

$C_{15}H_{19}NO_7$ (325.3)

Ber. C 55.38 H 5.89 N 4.31

Gef. C 55.61 H 6.o5 N 4.47

Einw. 4.22o mg CO_2 8.6o mg H_2O 2.28 mg

Einw. 5.2o5 mg o.2o8 ccm N_2 28/75o

35. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-äthyliden-D-fruktose.

Je o.33 g (o.oo1 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-4.6-äthyliden-D-glucosylamin wurden

a) in 5 ccm Glykolmonomethyläther 2 Stdn. bei 1oo°,

b) in 5 ccm Pyridin 3 Stdn. bei 1oo°,

c) in 3 ccm Glykolmonomethyläther 1 Stde. bei 8o° und

d) in 4 ccm Glykolmonomethyläther 5 Stdn. bei 8o°

erhitzt. Die Lösungen färbten sich dunkelbraun und zeigten mit alkalischer o-Dinitrobenzollösung starke Reaktion auf

Amadori-Verbindungen. Im Papierchromatogramm trat ein Fleck auf, der mit Triphenyltetrazoliumchlorid stärker reagierte als zum Beispiel 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-benzal-D-fruktose. Bei c) konnten 80% und bei d) 50% N-(o-Carboxyphenyl)-4.6-äthyliden-D-glucosylamin zurückgewonnen werden. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4.6-äthyliden-D-fruktose liess sich nicht in reiner Form isolieren.

36. Versuch zur Herstellung von 4.6-n-Propyliden-D-glucose.

18 g (0.1 Mol) wasserfreie D-Glucose wurden in 25 ccm n-Propionaldehyd suspendiert, 0.1 ccm konz. Schwefelsäure zugegeben, 3 Stdn. bei 80° gerührt und dann 24 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die entstandene, sirupöse Masse wurde mit 80 ccm Essigester versetzt. Auch nach mehrtägigem Abkühlen auf 0° trat keine Kristallisation ein.

37. Versuche zur Synthese von 4.6-Isobutyliden-D-glucose.

a) 18 g (0.1 Mol) wasserfreie D-Glucose wurden mit 75 ccm Isobutyraldehyd und 0.5 ccm konz. Schwefelsäure 4 Stdn. gerührt und 24 Stdn. bei 30° stehengelassen,

b) 36 g (0.2 Mol) wasserfreie D-Glucose mit 36 g wasserfreiem Zinkchlorid und 70 ccm Isobutyraldehyd eine Woche bei 37° und

c) 18 g (0.1 Mol) wasserfreie D-Glucose, 8.8 ccm (= 7 g) Isobutyraldehyd und 20 g wasserfreies Kupfersulfat eine Woche bei 37° stehengelassen.

Nach Filtration und Abkühlen erstarrte das Reaktionsgemisch zu einem dicken Kristallbrei von trimerem Isobutyraldehyd. Ein Zucker-Aldehyd-Kondensationsprodukt konnte in keinem Fall weder durch Eingiessen in Eiswasser noch durch Versetzen mit Essigester isoliert werden. Chromatographisch liessen sich nur Isobutyraldehyd und dessen Polymere nachweisen.

38. Versuch zur Herstellung von 4.6-(2-Aethyl-butyliden)-D-glucose.

18 g (o.1 Mol) wasserfreie D-Glucose wurden mit 5o ccm 2-Aethylbutanal und o.2 ccm konz. Schwefelsäure einen Tag bei Zimmertemperatur gerührt und dann eine Woche bei 37° stehengelassen. Weder durch Zugabe von Essigester noch durch Eingiessen in Eiswasser konnte Kristallisation erreicht werden.

39. Versuche zur Synthese von 4.6-(p-Methoxybenzal)-D-glucose.

a) 27 g (o.15 Mol) wasserfreie D-Glucose wurden mit 75 ccm Anisaldehyd und 15 g wasserfreiem Zinkchlorid einen Tag bei Zimmertemperatur gerührt, die Hälfte in Eiswasser gegossen, der Rest noch eine Woche bei 37° stehengelassen,

b) 9 g (o.o5 Mol) wasserfreie D-Glucose, 1o.2 g (o.o75 Mol) Anisaldehyd und 2o g Natriumsulfat 15 Stdn. in Aethanol am Rückfluss gekocht und

c) 9 g (o.o5 Mol) wasserfreie D-Glucose und 1o.2 g (o.o75 Mol) Anisaldehyd in 4o ccm Dioxan mit einigen Tropfen konz. Schwefelsäure 2 Tage auf 4o° erwärmt.

Weder durch Eingiessen in Eiswasser noch durch Zugabe von Essigester und Abkühlen konnte ein Kondensationsprodukt ausgefällt werden. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung im System Benzol/Methanol 7:1 ergab, dass in allen Fällen ein sehr schwacher, anilinphthalatpositiver Fleck bei R_F o.7 auftrat. (R_F Glucose o.3, R_F Anisaldehyd 1.o).

40. Versuche zur Synthese von 4.6-(p- und m-Nitrobenzal)-D-glucose.

a) 4.5 g (o.o25 Mol) wasserfreie D-Glucose wurden mit 5.1 g (o.o33 Mol) p-Nitrobenzaldehyd und 2o g Natriumsulfat in 2oo ccm Aethanol 15 Stdn. am Rückfluss gekocht,

b) 9 g (o.o5 Mol) wasserfreie D-Glucose mit 12 g (o.o8 Mol) m-Nitrobenzaldehyd in 25o ccm Dioxan, dem 1 ccm konz. Schwefelsäure zugefügt war, 2 Tage in einem mit

Calciumchlorid beschickten Soxhlet gekocht,

c) 4.5 g (o.o25 Mol) wasserfreie D-Glucose mit 18 g (o.12 Mol) m-Nitrobenzaldehyd und 2 Tropfen konz. Schwefelsäure 3 Stdn. auf loo° erhitzt und

d) 13.5 g (o.o75 Mol) wasserfreie D-Glucose mit 3o g (o.2 Mol) m-Nitrobenzaldehyd und 15 g wasserfreiem Zinkchlorid 24 Stdn. bei 7o° gerührt.

Bei a) konnte nach Abdampfen des Alkohols p-Nitrobenzaldehyd kristallin zurückgewonnen werden. Die bei c) und d) anfallenden, tiefbraunen Schmieren erstarrten nach dem Abkühlen zu einer steinharten Masse, die in Aethanol wenig, in Dioxan löslich und in Aceton sehr gut löslich war. Goss man die Dioxanlösung in Eiswasser, so fiel eine harzige, braune Masse aus, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. In allen Fällen liess sich chromatographisch kein Zucker-Aldehyd-Kondensationsprodukt nachweisen.

41. N-(o-Carboxyphenyl)-rhamnosylamin.

o.55 g (o.oo3 Mol) Rhamnose-hydrat und o.41 g (o.oo3 Mol) Anthranilsäure wurden in lo ccm Aethanol gelöst und 2o Min. auf 9o-95° erwärmt. Im Eisschrank fielen über Nacht weisse Kristalle aus. Nach Umkristallisation aus Aethanol erhielt man o.75 g (= 89% d.Th.) N-(o-Carboxyphenyl)-rhamnosylamin. α_D^{22}: +97.3° (7 Min.) --→ +79.3° (5 Tage, c=1, in Pyridin). Schmp. 165-166°.

$C_{13}H_{17}NO_6$	(283.3)		
	Ber.	C 55.12	H 6.o5 N 4.95
	Gef.	C 55.11	H 6.o5 N 5.21, 5.22
Einw. 4.234 mg	CO_2 8.55 mg		H_2O 2.29 mg
Einw. 4.623 mg	o.212 ccm N_2		23/749
Einw. 4.826 mg	o.215 ccm N_2		22/77o

Man erhält das Rhamnosylamin in 96-proz. Ausbeute, wenn man die gleichen Mengen wie oben in 5 ccm Dioxan und o.4 ccm Eisessig einen Tag bei 5o-6o° stehenlässt.

42. Versuche zur Synthese von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-rhamnoketose.

Je o.28 g (o.oo1 Mol) N-(o-Carboxyphenyl)-rhamnosylamin wurden

a) in 5 ccm Dimethylformamid 2 Stdn. bei 1oo°,

b) in 5 ccm Dioxan und o.5 ccm Eisessig 2o Stdn. bei 1oo°,

c) in 5 ccm Pyridin und o.5 ccm Eisessig 2o Min. bei 1oo° am Rückfluss erhitzt. Die Reaktion mit o-Dinitrobenzol war stark positiv, und im Papierchromatogramm konnte die Amadori-Verbindung durch ihre Reaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid nachgewiesen werden. Kristalle liessen sich nicht isolieren.

43. N-(p-Toluidino)-2-desoxy-D-glucosylamin.

o.35 g (o.oo2 Mol) 2-Desoxy-D-glucose und o.19 g (o.oo2 Mol) p-Toluidin wurden in Methanol gelöst und 1o Min. auf dem Wasserbad zum Sieden gebracht. Im Eisschrank fielen weisse Kristalle aus. o.46 g (= 92% d.Th.) (Ausbeute). Schmp. 187-188° (Zers.). α_D^{22}: -13o.9° (7 Min.) --→ -73.2° (3 Tage, c=1, in Pyridin).

$C_{13}H_{19}NO_4$	(253.3)			
	Ber.	C 61.64	H 7.56	N 5.53
	Gef.	C 61.61	H 7.63	N 5.4o
Einw. 4.314 mg	CO_2 9.74 mg		H_2O 2.94 mg	
Einw. 4.674 mg	o.225 ccm N_2	26/747		

Zusammenfassung

Die Biosynthese des Tryptophans verläuft bei Hefen und Neurospora crassa über 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat und bei Enterobacteriaceen über 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat. In den Kulturmedien liessen sich diese Verbindungen in entphosphorylierter Form nachweisen. Die Synthese der vier Amadori-Verbindungen wurde durch Umlagerung solcher Zucker- und Anthranilsäurederivate angestrebt, von denen angenommen werden konnte, dass sie bevorzugt umlagern und stabile Endprodukte liefern. Die Substituenten mussten unter schonenden Bedingungen abspaltbar sein.

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose wurde durch hydrogenolytische Abspaltung des Benzalrestes aus 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-4,6-benzal-D-fruktose und Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie als weisses, amorphes Pulver hergestellt. Die Umsetzung von Anthranilsäure mit 6-O-Trityl-D-glucose und 6-O-Benzoyl-D-glucose und von N-Benzylanthranilsäure mit D-Glucose, 6-O-Trityl-D-glucose und 4,6-Benzal-D-glucose führte in jedem Falle zur Bildung einer Amadori-Verbindung. Die Glykosylamine konnten teilweise nachgewiesen, N-(o-Carboxyphenyl)-6-O-trityl-D-glucosylamin in kristalliner Form isoliert werden.

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose liess sich durch Umlagerung von N-(o-Carboxyphenyl)-D-arabinosylamin mit anschliessender Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie als weisses, amorphes Pulver herstellen. 5-O-Trityl-D-ribose, 5-O-Trityl-D-arabinose und 5-O-Benzyl-D-ribose bildeten mit Anthranilsäure labile Amadori-Verbindungen.

1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-fruktose-6-phosphat

und 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat konnten ebenfalls durch präparative Dünnschichtchromatographie nach Umlagerung von Anthranilsäure und D-Glucose-6-phosphat bzw. D-Ribose-5-phosphat in einheitlicher, aber wenig stabiler Lösung hergestellt werden.

Im Zusammenhang mit den durchgeführten Syntheseversuchen sollte ausserdem durch systematische Variation des Zuckeranteils der Einfluss der Substitution auf die Amadori-Umlagerung geklärt werden. Die Umsetzung von D-Glucose mit n-Propionaldehyd, Isobutyraldehyd, 2-Aethylbutanal, Anisaldehyd, p- und m-Nitrobenzaldehyd führte unter verschiedenen Bedingungen nicht zu den gewünschten 4,6-Kondensationsprodukten. Aus Anthranilsäure und 4,6-Aethyliden-D-glucose bzw. Rhamnose wurden die Glykoside hergestellt, die stark reduzierende Amadori-Verbindungen bildeten.

Literaturverzeichnis

1. A.Abrams, P.H.Lowy u. H.Borsook, J.Amer.chem.Soc. 77, 4794 (1955)
2. M.Amadori, Atti reale accad. Lincei 2, 337 (1925)
3. M.Amadori, Atti reale accad. Lincei 13, 72,195 (1931)
4. B.N.Ames u. H.K.Mitchell, J.biol.Chemistry 212, 687 (1955)
5. B.N.Ames, J.biol.Chemistry 228, 131 (1957)
6. Amino Acid Metabolism, McElroy und B.Glass, Johns Hopkins Press 1955
7. R.H.Anderson, J.org.Chemistry 19, 1238 (1954)
8. H.Borsook, A.Abrams u. P.H.Lowy, J.biol.Chemistry 215, 111 (1955)
9. H.Borsook u. P.H.Lowy, J.Amer.chem.Soc. 78, 3175 (1956)
10. H.Bredereck, M.Köthnig u. E.Berger, Ber.dtsch.chem.Ges. 73B, 956 (1940)
11. N.W.Bristow u. B.Lythgoe, J.Chem.Soc. (London) 1949, 2309
12. N.M.Carter, Chem.Ber. 63, 1684 (1930)
13. F.Cramer, Angew.Chem. 72, 244 (1960)
14. B.D.Davis, J.biol.Chemistry 191, 315 (1951)
15. B.D.Davis u. E.S.Mingioli, J.Bacteriol. 66, 129 (1953)
16. C.H.Doy u. F.W.E.Gibson, Biochem.J. 72, 586 (1959)
17. G.P.Ellis, Advances in Carbohydrate Chem. 10, 95-168 (1955)
18. G.P.Ellis, Advances in Carbohydrate Chem. 14, 63-134 (1959)
19. P.Fildes, Brit.J.exp.Pathol. 21, 315 (1940)
20. P.Fildes, Brit.J.exp.Pathol. 22, 293 (1941)

21. R.Fischer u.a., Helv.Chim.Acta 37, 6 (1954)

22. K.Freudenberg u. G.Hüll, Chem.Ber. 74, 237 (1941)

23. F.W.E.Gibson, H.J.Jones u. H.Teltscher, Nature (London) 175, 853 (1955)

24. F.W.E.Gibson, C.H.Doy u. S.B.Segall, Nature (London) 181, 549 (1958)

25. A.Gottschalk, Biochem.J. 52, 455 (1952)

26. A.Gottschalk, J.Agr. Food Chem. 1, 928 (1953)

27. B.Helferich u. A.Porck, Liebig's Ann. Chem. 582, 233 (1953)

28. B.Helferich, L.Moog u. A.Jürgen, Chem.Ber. 58, 872 (1925)

29. K.Heyns u. H.Paulsen, Liebig's Ann. Chem. 622, 160 (1959)

30. K.Heyns u W.Baltes, Chem.Ber. 93, 1616 (1960)

31. K.Heyns u. H.Breuer, Chem.Ber. 91, 2750 (1958)

32. K.Heyns, H.Breuer u. H.Paulsen, Chem.Ber. 90, 1374 (1957)

33. R.C.Hockett, D.V.Collins u. A.Scattergood, J.Amer.chem.Soc. 73, 599 (1951)

34. J.E.Hodge, Advances in Carbohydrate Chem. 10, 169-205 (1955)

35. J.E.Hodge u. C.E.Rist, J.Amer.chem.Soc. 74, 1494 (1952)

36. J.E.Hodge u. C.E.Rist, J.Amer.chem.Soc. 75, 316 (1953)

37. J.C.Irvine u. R.Gilmour, J.Chem.Soc. (London) 95, 1553 (1909)

38. F.Kaudewitz, Z.Naturforsch. 10b, 562 (1955)

39. G.W.Kenner, C.W.Taylor u. A.R.Todd, J.Chem.Soc. (London) 1949, 1620

40. A.Klemer u. F.Micheel, Chem.Ber. 89, 1242 (1956)

41. R.Kuhn u. F.Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 769 (1937)

42. R.Kuhn u. G.Krüger, Liebig's Ann.Chem. 628, 240 (1960)

43. R.Kuhn u. L.Birkofer, Chem.Ber. 71, 621 (1938)

44. H.A.Lardy u. H.O.L.Fischer,
Biochem.Preparations 2, 39 (1952)

45. J.G.Levin u. D.B.Sprinson,
Biochem. a. Biophys.Res.Comm. 3, 157 (1960)

46. F.Lingens, H.J.Burkhardt, H.Hellmann u. F.Kaudewitz,
Z.Naturforsch. 12b, 493 (1957)

47. F.Lingens u. H.Hellmann, Angew.Chem. 69, 97 (1957)

48. F.Lingens, H.Hellmann u. M.Hildinger,
Z.Naturforsch. 13b, 727 (1958)

49. F.Lingens, M.Hildinger u. H.Hellmann,
Biochim.Biophysica Acta (Amsterdam) 30, 668 (1958)

50. F.Lingens u. S.Kern,
Hoppe Seyler's Z. physiol.Chem. 318, 56 (1960)

51. F.Lingens u. H.Hellmann,
Liebig's Ann.Chem. 630, 84-88 (1960)

52. F.Lingens u. H.Hellmann, Z.Naturforsch. 13b, 462 (1958)

53. L.C.Maillard, Compt.rend. 154, 66 (1912)

54. F.Micheel u. G.Hagemann, Chem.Ber. 92, 2836 (1959)

55. F.Micheel u. B.Schleppinghoff, Chem.Ber. 89, 1702 (1956)

56. F.Micheel u. A.Frowein, Chem.Ber. 90, 1599 (1957)

57. F.Micheel, Angew.Chem. 69, 209 (1957)

58. F.Micheel u. A.Frowein, Angew.Chem. 69, 562 (1957)

59. F.Micheel u. A.Frowein, Chem.Ber. 92, 304 (1959)

60. F.Micheel u. A.Heesing, Chem.Ber. 94, 1814 (1961)

61. E.Mitts u. R.M.Hixon, J.Amer.chem.Soc. 66, 483 (1944)

62. R.K.Mortimer, R.S.Lerner u. J.K.Barr,
U.S.Atomic Energy Commission UCRL-3746 (1957)

63. A.Müller, M.Moricz u. G.Vlener,
Chem.Ber. 72, 745 (1939)

64. J.F.Nyc, H.K.Mitchell, E.Liefer u. W.H.Langham,
J.biol.Chemistry 179, 783 (1949)

65. L.W.Parks u. H.C.Douglas,
Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 23, 207 (1957)

66. C.W.H.Partridge, D.M.Bonner u. C.Yanofsky,
J.biol.Chemistry 194, 269 (1954)

67. S.M.Partridge, Nature (London) 164, 443 (1949)

68. W.Pigman, E.A.Cleveland, D.H.Couch u. J.H.Cleveland,
J.Amer.chem.Soc. 73, 1976 (1951)

69. D.D.Reynolds u. W.L.Evens,
Org.Syntheses 22, 56 (1942)

70. L.Rosen, J.W.Woods u. W.Pigman,
Chem.Ber. 90, 1038 (1957)

71. I.I.Salamon u. B.D.Davis, J.Amer.chem.Soc.
75, 5567 (1953)

72. O.Th.Schmidt u. W.Staab, Chem.Ber. 87, 388 (1954)

73. H.T.Shigeura u. D.B.Sprinson,
Federation Proc. 11, 286 (1952)

74. L.I.Smith u. R.H.Anderson,
J.org.Chemistry 16, 963 (1951)

75. L.I.Smith u. R.H.Anderson,
J.org.Chemistry 16, 972 (1951)

76. E.E.Snell, Arch.Biochemistry 2, 389 (1943)

77. P.R.Srinivasan, M.Katagiri u. D.B.Sprinson,
J.biol.Chemistry 234, 713 (1959)

78. P.R.Srinivasan u. D.B.Sprinson,
J.biol.Chemistry 234, 716 (1959)

79. E.Stahl, Pharmaz.Rdsch. 1, 1 (1959)

80. H.H.Strain u. H.A.Spohr,
J.biol.Chemistry 89, 527 (1930)

81. E.L.Tatum u. D.M.Bonner,
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 30, 30 (1944)

82. E.L.Tatum, D.M.Bonner u. G.W.Beadle,
Arch.Biochemistry 3, 477 (1944)

83. E.L.Tatum u. D.Shemin,
J.biol.Chemistry 209, 671 (1954)

84. W.W.Umbreit, W.A.Wood u. I.C.Gunsalus,
J.biol.Chemistry 165, 731 (1946)

85. A.I.Vogel, Practical Org.Chem. S. 363, 554

86. K.Wallenfels, Naturw. 37, 491 (1950)

87. U.Weiss, B.D.Davis u. E.S.Mingioli,
J.Amer.chem.Soc. 75, 5572 (1953)

88. G.Weitzel, H.U.Geyer u. A.M.Fretzdorff,
Chem.Ber. 90, 1153 (1957)

89. F.Weygand, H.Simon u. R.v.Ardenne,
Chem.Ber. 92, 3117 (1959)

90. F.Weygand, H.Simon, G.Dahms, M.Waldschmidt, J.Schliep
u. H.Wacker, Angew.Chem. 73, 402 (1961)

91. F.Weygand, Chem.Ber. 73, 1259 (1940)

92. Th.Wieland u. F.Jaenicke, Chem.Ber. 88, 1967 (1955)

93. C.Yanofsky, J.biol.Chemistry 194, 279 (1952)

94. C.Yanofsky, J.biol.Chemistry 217, 345 (1955)

95. C.Yanofsky,
Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 16, 594 (1955)

96. C.Yanofsky, Science (New York) 121, 138 (1955)

97. C.Yanofsky,
Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 20, 438 (1956)

98. C.Yanofsky, J.biol.Chemistry 223, 171 (1956)

99. L.Zervas, Ber.dtsch.chem.Ges. 64, 2289 (1931)

100. K.Zeile u. W.Kruckenberg, Chem.Ber. 75, 1127 (1942)

101. H.Zinner, K.Wessely, W.Bock, K.Rieckhoff, F.Strandt u. W.Nimmich, Chem.Ber. 90, 500 (1957)

102. H.Zinner, G.Rembarz u. H.P.Klöcking, Chem.Ber. 90, 2688 (1957)

103. H.Bredereck, Chem.Ber. 68II, 2299 (1935)

L e b e n s l a u f

Am 22. April 1933 wurde ich, Eckhard Schraven, als Sohn des Formers Johann Schraven und seiner Frau Mathilde, geb. Schlagböhmer, in Oberhausen-Sterkrade geboren.

Von 1939 bie 1943 besuchte ich die Pestalozzi-Schule in Oberhausen-Sterkrade und anschliessend ein Jahr die Oberschule für Jungen in Dinslaken. Von Wiederaufnahme des Unterrichts Ende 1945 besuchte ich bis 1950 das Neusprachliche Gymnasium in Oberhausen-Sterkrade und wechselte dann zum Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Oberhausen, wo ich im März 1953 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Chemie. Im Juni 1956 legte ich dort das Vorexamen für Chemiker ab und im Juni 1959 die Diplomhauptprüfung.

Anschliessend führte ich die Diplom- und Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr. F. Lingens durch. Das Thema meiner Doktorarbeit lautete: "Synthesen von Amadori-Verbindungen der Anthranilsäure".

Meine akademischen Lehrer waren:
In Chemie: K.Brodersen, H.Hellmann, F.Kaudewitz, A.Knappwost, G.Kortüm, F.Lingens, E.Müller, W.Rüdorff und G.Wittig.
In Physik und Mathematik: W.Kossel, G.Möllenstedt, G.Mühleisen und W.Schweizer.
In Mineralogie: W.v.Engelhardt und K.Spangenberg.